

**Universidad Nacional de La Plata**

**Facultad de Ciencias Exactas**

**Licenciatura en Ciencia y Tecnología de los  
Alimentos**



# Determinación de la efectividad de recubrimientos para incorporar prebióticos y bacterias potencialmente probióticas a galletitas destinadas a cánidos domésticos adultos



Lucía del Sol González Forte

Dirección: Dra. Miriam N. Martino

Co-dirección: Dra. Estela D. Bruno

Febrero 2012

Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos  
(CIDCA)

# Agradecimientos

Sin un orden estricto...

- ✚ A mis padres, Amalia y Guillermo, por acompañarme y bancarme durante estos 6 años.
- ✚ A Diego, por crecer conmigo a lo largo de todo este camino.
- ✚ A mi hermana Laura, por ser mi ejemplo de mujer.
- ✚ A Miriam y Estela por su conocimiento, experiencia y asesoramiento. También por su alegría, su humor y sus infaltables mates.
- ✚ Al CIDCA y a toda su gente por brindarme un espacio donde llevar a cabo esta investigación y por su ayuda.
- ✚ A la Facultad de Ciencias Exactas y a los profesores que me guiaron.
- ✚ A mis amigos, los de siempre y los que conocí en el camino de la Universidad, que me brindan su cariño y me aguantan. Un especial agradecimiento a Romi, mi hermana del alma.
- ✚ A Malú, Daphne y Fermina por ser mi compañía durante largas horas de estudio.

Un país, una civilización,  
se puede juzgar por la forma  
en que trata a sus animales.

Mahatma Gandhi

## **1. INTRODUCCIÓN**

---

|  |    |
|--|----|
| 1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES              | 1  |
| 1.1.1 Probióticos                      | 3  |
| 1.1.2 Prebióticos                      | 5  |
| 1.2 FORMULACIÓN DEL SUPLEMENTO         | 7  |
| 1.3 RECUBRIMIENTOS                     | 10 |
| 1.4 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL | 11 |

## **2. OBJETIVOS**

---

|                           |    |
|---------------------------|----|
| 2.1 OBJETIVO GENERAL      | 13 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 13 |

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---

|   |    |
|---|----|
| 3.1 PREPARACIÓN DE LAS GALLETITAS   | 14 |
| 3.1.1 Ingredientes para la formulación  | 14 |
| 3.1.2 Elaboración de la masa  | 16 |
| 3.1.3 Horneado  | 16 |
| 3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS GALLETITAS   | 16 |
| 3.2.1 Determinación de color superficial  | 17 |
| 3.2.2 Análisis de textura   | 18 |
| 3.3 PREPARACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS   | 20 |
| 3.3.1 Recubrimiento de Alginato de Calcio   | 20 |
| 3.3.2 Recubrimiento de Almidón  | 20 |
| 3.3.3 Evaluación de la integridad del recubrimiento                                       | 21 |
| 3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUOSA ( $a_w$ )  | 21 |
| 3.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD  | 22 |
| 3.6 PREPARACIÓN DE LAS GALLETITAS CON EL AGREGADO<br>DE COMPUESTOS ACTIVOS POTENCIALMENTE |    |

|   |    |
|---|----|
| PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS   | 22 |
| 3.6.1 Cultivo bacteriano  | 22 |
| 3.6.2 Activación, mantenimiento y preparación del cultivo   | 22 |
| 3.6.3 Agregado de inulina y trehalosa   | 23 |
| 3.7 RECUENTO BACTERIANO EN AGAR-MRS   | 24 |
| 3.8 VIABILIDAD IN VITRO DE LAS BACTERIAS SOBRE<br>LAS GALLETITAS  | 25 |
| 3.9 VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS DURANTE EL<br>ALMACENAMIENTO  | 25 |
| 3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO   | 26 |
| <u>ANEXO: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO<br/>Y SOLUCIONES</u>   | 27 |
| <b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>  |    |
| 1. CONDICIONES DE HORNEADO  | 29 |
| 2. SELECCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS  | 34 |
| 3. EFECTO DEL RECUBRIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE<br><i>L. PLANTARUM</i> EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL | 38 |
| 4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL PRODUCTO  | 41 |
| <b>5. CONCLUSIONES</b>  | 46 |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>  | 48 |

## **1.1 ALIMENTOS FUNCIONALES**

En los últimos años, las culturas occidentales han estado en búsqueda de alimentos que además de tener altos valores nutricionales sean beneficiosos para la salud. Según la Secretaria de Agricultura de Ganadería y Pesca (2007), algunos de los factores que influyen en esta búsqueda son:

- Consumidores que reconocen en forma creciente la relación existente entre la dieta y la salud.
- El envejecimiento de la población de los países centrales que conlleva un aumento proporcional de personas preocupadas por el cuidado de su salud.
- El incremento de los costos relacionados con la atención médica y los tratamientos de enfermedades, que fomentan la prevención de enfermedades.
- Los avances logrados en tecnología alimentaria y en las investigaciones sobre nutrición.

La legislación alimentaria japonesa reconoce 12 clases diferentes de ingredientes que favorecen la salud: 1) Fibra dietética; 2) Oligosacáridos; 3) Polioles; 4) Péptidos y proteínas; 5) Glúcidos; 6) Alkoholes; 7) Vitaminas; 8) Colinas; 9) Bacterias Lácticas; 10) Minerales; 11) Ácidos grasos polinsaturados; 12) otros (Vasconcellos, 2001).

Dentro de los alimentos funcionales, los prebióticos, probióticos y simbióticos, constituyen el segmento de mayor difusión a nivel mundial, y la FDA (Food and Drug Administration) los reconoce como ingredientes seguros para los cuales no es necesario establecer límites máximos permitidos en alimentos (clasificación GRAS: General y Recognized As Safe).

Es importante remarcar que los efectos de estos alimentos funcionales pueden ser divididos en efectos funcionales y efectos sobre la salud. Los efectos funcionales, como la atenuación del colesterol, el equilibrio de la flora intestinal, la modulación inmunológica, la acción antioxidante, etc., son acciones metabólicas más fáciles de demostrar y muchos ya son aceptados como afirmaciones científicas.

Asimismo, se destaca el crecimiento de la industria de la alimentación animal. En las últimas décadas, especialmente en los países desarrollados, se ha incrementado notablemente el número y la importancia de los animales de compañía, al punto que existen trabajos

que muestran que éstos contribuyen a la salud del hombre, tanto en términos fisiológicos como psicológicos (Tanabe, 2001). Tras la domesticación, el perro se fue alejando progresivamente del régimen carnívoro de sus ancestros salvajes para adoptar la alimentación que el hombre le propuso. Por este motivo, el hombre debe proporcionarle una cantidad adecuada de nutrientes de alta calidad, en una dieta bien formulada durante toda la vida del animal que contribuirá a obtener un estado óptimo de salud y al mantenimiento de un estado ideal de peso corporal.

La alimentación industrial apareció a comienzos del siglo XIX basándose en el bienestar de los animales de compañía y la menor disponibilidad de tiempo de los dueños por su creciente actividad laboral. Esto hizo surgir un mercado muy específico y de alta rentabilidad. La comercialización de los productos secos es la de mayor preponderancia, resultan más económicos y pueden también contribuir a mantener una higiene dental-gingival y soportan bien su almacenamiento debido a su escaso contenido en humedad, lo que a su vez ayuda a evitar la alteración por bacterias y hongos (Case y col., 1997; Tanabe, 2001).

Según el Código Alimentario Argentino (CAA), se define como suplemento dietario a los productos destinados a incrementar la ingesta diaria habitual, suplementando la incorporación de nutrientes en la dieta de animales sanos que, no encontrándose en condiciones patológicas, presenten necesidades básicas dietarias no satisfechas o mayores a las habituales. Siendo su administración por vía oral, deben presentarse en formas sólidas (comprimidos, cápsulas, granulados, polvos u otras) o líquidas (gotas, solución, u otras) y otras formas para absorción gastrointestinal, contenidas en envases que garanticen la calidad y estabilidad de los productos.

Dada la necesidad de diseñar distintas dietas según el estado fisiológico del animal, se ha elegido trabajar con el cánido doméstico adulto en estado de mantenimiento, que es aquel que ha llegado a su tamaño maduro adulto y que no está preñado, lactando o trabajando de manera extrema (Desmukh, 1998).

En el presente trabajo se pretende ahondar en el desarrollo de un suplemento funcional en forma de galletitas para cánidos adultos en estado de mantenimiento, tema que viene desarrollándose en el laboratorio (Bruno, 2009), con la incorporación de bacterias potencialmente probióticas y sustancias prebióticas.

El Código Alimentario Argentino Artículo 760 - (Res. Conj. 31 y 286/03) define con la denominación genérica de Galletitas y Bizcochos (Cakes, Crackers, Biscuits, etc.), a numerosos productos a los que se les da formas variadas antes del horneado de una masa elaborada a base de harina de trigo u otras o sus mezclas, con o sin agentes químicos y/o biológicos autorizados. Los productos terminados deberán cumplir las exigencias que se establecen en el Artículo 766 del Código Alimentario Argentino: podrán presentarse en forma de unidades aisladas o constituidas por dos o más adheridas entre sí por medio de productos alimenticios o preparaciones cuyos componentes se encuentren admitidos en dicho Código, y recubiertas o no parcial o totalmente con sustancias o adornos cuyos constituyentes se encuentren permitidos. El producto terminado no deberá contener más de 12 % de agua.

### **1.1.1 Probióticos**

Según la definición aprobada por la National Yogur Association (NYA) y por el International Life Science Institute (ILSI) en EEUU (2002) se denomina probióticos a microorganismos vivos, los cuales al ser ingeridos en suficiente número, ejercen beneficios para la salud más allá de la nutrición básica (Garrote y col, 2001).

Isolauri (2001) y Gismondo y col. (1999) han estudiado los principales efectos que las bacterias lácticas vivas pueden ejercer sobre la salud del huésped a partir de su presencia en el tracto intestinal, como en los casos de diarrea ligada al suministro de bacterias lácticas vivas (por ejemplo, a través de leches fermentadas), o la prevención de las mismas. Se ha relacionado este efecto directamente con la capacidad de estas bacterias para resistir la colonización intestinal por bacterias entéricas patógenas (*Salmonella*, *E. coli*, etc). Esta acción se atribuye a: la competencia por los sitios receptores de adhesión al epitelio intestinal; la producción de sustancias antibacterianas (ácidos orgánicos y antibióticos) y/o la estimulación del sistema inmune (Perdigón y col., 1990). Perdigón y col. (1993) y Reinheimer (1994) aseguran que existe suficiente evidencia de que cepas de lactobacilos, o los productos lácteos fermentados con éstas, inhiben líneas tumorales transplantadas en ratas.

Garrote y col. (2001) han estudiado los efectos probióticos de *L. plantarum*, siendo ésta una bacteria muy versátil que puede colonizar el tracto gastrointestinal tanto de humanos como mamíferos. Además *L. plantarum* es



una especie importante en la fermentación de productos vegetales (Ashenafi y Busse, 1991) y es conocido por producir sustancias antimicrobianas, como la plantaricina, que son activas contra ciertos patógenos (Muck, 1996).

En el presente estudio se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 aislada de gránulos de kefir CIDCA AGK1, perteneciente al centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA). Esta cepa inhibe el desarrollo de *Escherichia coli* (Garrote, 2000), *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* y disminuye la acción citotóxica de la toxina shiga de *E.coli enterohemorrágica* en forma específica (Kakisu y col., 2006).

Dados sus beneficios sobre la salud, los probióticos han sido incluidos en un amplio rango de productos. Muchos estudios dan cuenta de la incorporación en productos de consumo diario tales como: queso, yoghurt, helado; y también en otro tipo de alimentos como carne, frutas, galletitas, cereales, chocolate, etc. Sin embargo, se busca ampliar los horizontes hacia otro mercados, con bacterias probióticas libres o encapsuladas (Burgain, 2011).

### **1.1.2 Prebióticos**

Los alimentos prebióticos son definidos como: "Ingredientes no digestibles que afectan beneficiosamente al organismo mediante la estimulación del crecimiento y actividad de una o varias cepas de bacterias en el colon, mejorando la salud del huésped" (Kolida y col. 2002; Tannock y col. 2004). Combinando estas sustancias químicas específicas con la administración de probióticos (bacterias exógenas) se produce un efecto sinérgico sobre una gran variedad de procesos metabólicos (Tomomatsu, 1994).

Los oligosacáridos forman un grupo importante dentro de estos compuestos, existen dos grupos específicos: los fructo-oligosacáridos (FOS) y los galacto-oligosacáridos (GOS) (Spiegel y col., 1994; Southgate, 1995). Los fructooligosacáridos (FOS) son azúcares con características de fibras fermentables. No se digieren pero la flora bacteriana del intestino los fermenta rápidamente, produciendo ácidos grasos volátiles (acetato, propionato y butirato), necesarios para el mantenimiento y el crecimiento de las células que tapizan las paredes del intestino grueso. Según Reinhardt (1997), ejercerían un "efecto barrera" protegiendo el tubo digestivo.

Wang y col. (1993); Spiegel y col. (1994) y Strickling y col. (2000), asocian el consumo de FOS a un mejor aprovechamiento de diversos minerales como el calcio y el magnesio, componentes fundamentales en los huesos y dientes. Además, dentro de las características saludables de los FOS pueden citarse: su baja dulzura (1/3 de la sacarosa), prácticamente no aportan energía, no son cariogénicos, son bifidogénicos y disminuyen los niveles séricos de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos.

El almidón resistente también es considerado una fibra, y es la parte del almidón que no puede ser digerido por las enzimas pancreáticas en el intestino delgado y que por lo tanto llega intacto al colon donde es fermentado. Esta particularidad provee características interesantes ya que el almidón resistente puede ser utilizado por bacterias probióticas (Khalida y col., 2000).

La inulina se encuentra en más de 36.000 plantas y constituye su reserva de energía. Está compuesta por unidades de fructosa (entre 2 y 60 unidas por enlaces  $\beta$  2-1) con dos moléculas de glucosa en los extremos (Fig. 1). La inulina además entra en la clasificación de las fibras solubles. Tiene una amplia aplicación en la industria alimentaria gracias a su gran versatilidad, difícilmente influye en el sabor o en la apariencia visual del producto. Además es muy resistente al calor, es inodora e hipoalergénica.

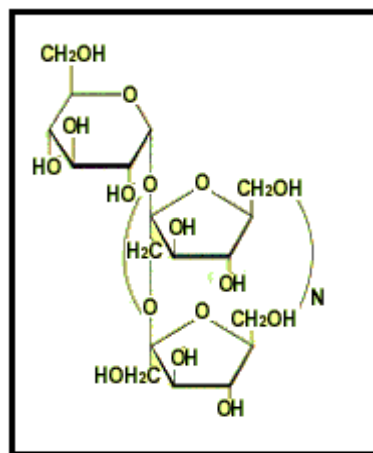


Fig. 1 Molécula de inulina.

## **1.2 FORMULACIÓN DEL SUPLEMENTO**

En trabajos previos se desarrollaron formulaciones de galletitas que podrían constituir suplementos o premios para enriquecer la dieta de cánidos domésticos. Se analizaron los efectos de distintas harinas, agregado de minerales, y extractos de remolacha con propiedades antioxidantes sobre diversas características macroscópicas (Bruno, 2009). Con el trabajo actual se pretende ahondar en el mejoramiento de dichas formulaciones con el agregado de prebióticos, trehalosa y bacterias potencialmente probióticas.

En la elaboración de las galletitas es importante la clase y tipo de harina empleada no sólo por su aporte nutricional sino por las propiedades macroscópicas del producto final. En el presente trabajo fueron seleccionadas para las formulaciones: harina de trigo, y la mezcla de harinas de soja e integral de trigo.

La utilización de harinas está fundamentada principalmente por el aporte de ciertos nutrientes importantes en la alimentación animal. Según el Código Alimentario Argentino actualizado (CAA) se conoce con la denominación de “harina”, al producto de la molienda del endosperma del grano de trigo que responda a las exigencias de este. Estas exigencias son: el grano debe presentarse libre de impurezas, productos extraños, materias terrosas, parásitos y en perfecto estado de conservación, ni alterado, averiado, o fermentado.

La *Harina integral de trigo* es una harina oscura que se obtiene de la molienda del grano de trigo con todas sus envolturas celulósicas. Esta harina puede utilizarse sola.

La *Harina de soja* contiene un alto porcentaje de proteínas (35%) de alta calidad, que poseen todos los aminoácidos esenciales. Los nutrientes presentes en las semillas de soja actúan mejorando el sistema circulatorio y nervioso. Su porcentaje de fibras previene el estreñimiento (Padgett y col., 1995; Ramos y col.; Wang y col., 2008).

Además de las proteínas, otro componente importante de las harinas es el almidón, siendo un polisacárido que actúa como reserva de las plantas. En los tejidos vegetales se encuentra bajo la forma de gránulos intracelulares compactos; con aspecto y estructura según la especie vegetal de la que provienen. Frente a la luz polarizada los gránulos son refringentes, pudiendo observarse una cruz oscura con centro en el hilum (Whistler y BeMiller, 1984). Su función nutricional es muy importante porque después de la hidrólisis digestiva se transforma en glucosa, que es la principal fuente de energía (Cheftel y Cheftel, 1977).

En la soja, el contenido de almidón en semillas inmaduras es del 10 a 15 % mientras que en las maduras es del 0,19 al 0,91% (Stevenson y col., 2007).

El cloruro de sodio y los hidratos de carbono de bajo peso molecular, se utilizan para el control de la actividad acuosa de los alimentos, reducir el desarrollo microbiano y prolongar la vida útil, además de otras funciones para el desarrollo de la masa cruda y horneada (BeMiller y Whistler, 2000).

Por otra parte, muchos azúcares están involucrados en la preservación de organismos vivos bajo condiciones extremas. Entre los azúcares utilizados, la trehalosa se ha encontrado en altas concentraciones en numerosas bacterias, hongos y levaduras tolerantes a la deshidratación y tanto a bajas como altas temperaturas (Singer y Lindquist, 1998). Además del calor, otras condiciones de stress como presencia  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etanol y ácidos pueden inducir la síntesis de trehalosa (Martins y col. 2008). Basado en estos hechos, se han utilizado azúcares y especialmente trehalosa, en la criopreservación de embriones, microorganismos, enzimas y proteínas de uso terapéutico (Cerruti y col., 2000; Santagapita y col., 2008). Aunque el mecanismo de acción de la trehalosa en sus distintas aplicaciones no se conoce totalmente, se le han atribuido cualidades excepcionales como formadora de estado vítreo (acción cinética) y estabilizadora de proteínas y membranas (Mazzobre y col., 2001; Katkov y Levine, 2004).

El aumento de la viscosidad producido por la concentración de trehalosa inhibiría el movimiento de proteínas y enzimas conservando su entorno y estabilizando sus estructuras. Linders y col. (1997) estudiaron las posibilidades de minimizar la inactivación de cepas de *L. plantarum* durante el secado por lecho fluidizado con mezclas binarias y terciarias de almidón y azúcares. Otros investigadores utilizaron alginatos y trehalosa para inmovilizar bacterias lácticas y mantener su supervivencia (Li y col., 2008; Li y Chen, 2009).

Por último, el agua es el principal componente de muchos alimentos. El agua en la cantidad, localización y orientación apropiadas influye profundamente en la estructura, aspecto y sabor de los alimentos y en su susceptibilidad a la alteración. Es determinante de la velocidad de muchas reacciones químicas, tanto deseables como indeseables, está asociada a los constituyentes no acuosos de formas tan complejas que una vez que estas asociaciones se alteran por congelación o desecación ya nunca pueden restaurarse completamente (Fennema, 2000).

Durante la cocción la masa se transforma en galletita al someterla al calor uniforme y húmedo de un horno. Los componentes de la harina experimentan de este modo variaciones de naturaleza física y química que hacen de la masa plástica de forma variable, la galleta sólida que conserva su forma. Las elevadas temperaturas de los hornos de cocción, obran sobre la masa de las galletitas primeramente gelatinizando parcialmente el almidón de la capa exterior y después convirtiéndolo en dextrina con desprendimiento de agua. Al aumentar la temperatura y continuar el desprendimiento de agua se endurece cada vez más esta capa exterior, con una nueva descomposición simultánea de la dextrina, en productos de tostación. Se forma una capa dura externa que recibe el nombre de corteza. La temperatura del horno debe regularse de modo que la descomposición llegue sólo hasta la formación de estos productos de tostación. Si la temperatura es muy elevada, se descompone la harina con desprendimiento de carbón negro y la corteza se quema. La temperatura penetra sólo lentamente en el interior de la masa, las modificaciones se efectúan por lo tanto con menor intensidad. A temperaturas de 60-65°C se hincha y gelatiniza el almidón y a 65-70°C empieza también a coagularse el gluten. No se verifica una pérdida considerable de agua, tanto menos cuando la costra que lo rodea retiene el vapor y hace imposible un

nuevo aumento de la temperatura (Baik y col., 2000; Gupta, 2001; Ullmann, 1948).

### **1.3 RECUBRIMIENTOS**

En el presente trabajo el uso de recubrimientos surge de la necesidad de proteger a *L. plantarum* de las condiciones adversas del tracto gastrointestinal y constituir un vehículo para las bacterias. Varios autores han utilizado técnicas de encapsulación o inmovilización de bacterias con el fin de lograr que un mayor número lleguen viables al intestino (Gilson y Thomas, 1995; Lee y Heo, 2000; Khalida y col., 2000; Krasaekoopt y col., 2004).

Tanto para la encapsulación como para la obtención de películas y recubrimientos se utilizan diversos hidrocloides, entre ellos: alginato, gelano, goma xántica, quitosano, almidón, carragenano, etc. (Iyer y Kailasapathy, 2005; George y Abraham, 2006; Chen y Subirade, 2006; Ding y Shah, 2007; Burgain y col., 2011).

El alginato es un polisacárido natural extraído de varias especies de algas. Está compuesto por ácido  $\beta$ -D-manurónico y ácido L-gulurónico. La composición de las cadenas del polímero varía en cantidad y distribución secuencial según la fuente de la que provienen, y esto tiene influencia sobre las propiedades funcionales del alginato como material de soporte.

Los hidrogeles de alginato son ampliamente utilizados para encapsulación de células, y particularmente el alginato de calcio se prefiere para encapsular probióticos por su ausencia de toxicidad, su biocompatibilidad y su bajo costo. Sin embargo, algunas desventajas se atribuyen al uso de este compuesto, por ejemplo se sabe que en el estómago, frente al bajo pH, las cápsulas se contraen, y el contenido no se libera; luego cuando en el intestino las condiciones de pH varían y éste se eleva, la cubierta de ácido algínico se convierte en una capa soluble y viscosa que podría tener ventajas a la hora de buscar una liberación controlada del contenido de las cápsulas (George y Abraham, 2006). Otras desventajas tienen que ver con la dificultad de escalar los procesos a nivel industrial (Burgain y col. 2011).

Los almidones tienen un papel importante en la tecnología alimentaria debido a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales. En el laboratorio se han desarrollado y caracterizado recubrimientos y películas activas a base de

almidones con diversas aplicaciones (García M. A. y col., 2001; García y col., 2009).

#### **1.4 CARACTERIZACIÓN DEL PRODUCTO FINAL**

La calidad de un producto terminado puede ser definida con un amplio criterio, teniendo en cuenta características químicas, físicas, microbiológicas, o simplemente la aceptación por parte del consumidor. Por lo tanto, la calidad tiene que ser evaluada por numerosos ensayos de grado variable de objetividad, que en conjunto deben reunir las siguientes características:

- a) el producto debe ser sano para el consumo animal, y cumplir con las reglamentaciones vigentes en materia de salud.
- b) debe ser capaz de alcanzar su vida útil especificada sin deterioro.
- c) debe tener las características organolépticas tan altas como el productor pueda lograr.

El examen de los puntos anteriormente citados implica numerosos ensayos de laboratorio, pero no hay que perder de vista que la calidad del producto final depende desde la calidad de las materias primas y de las buenas prácticas de manufactura de la planta de producción (Tamine y Robinson, 1985).

En el estudio del producto final debe tener en cuenta:

- a) análisis de la composición química: existe en nuestro país normas legales, o al menos regulaciones provisionales, en cuanto a la composición del suplemento.
- b) ensayos microbiológicos: la investigación de organismos contaminantes está indicada para proteger al consumidor de especies potencialmente patógenas, y asegurar que el alimento no sufra deterioro microbiológico anticipadamente a que se cumpla el plazo estipulado de vida útil. La vida útil de un alimento es el período de tiempo para el cual el producto comienza a ser inaceptable desde el punto de vista sensorial, nutritivo o sanitario.
- c) ensayos de las características físicas como color y textura. Los métodos instrumentales como texturómetro, colorímetro, espectrofotómetro, peachímetro, etc., tienen algunas ventajas sobre los sensoriales ya que resulta más fácil su realización y estandarización. Sin embargo las

respuestas no están siempre claramente definidas y los resultados dependen de distintas variables (Bertola, 1992).

- d) Los ensayos sensoriales en animales domésticos requieren de una infraestructura específica como caniles, suficiente número de animales dependiendo del ensayo (raza, edad), personal de mantenimiento y estudios de laboratorio.



## **2.1 OBJETIVO GENERAL**

- ❖ Desarrollar un suplemento funcional para cánidos adultos en estado de mantenimiento, en forma de galletitas con características potencialmente probióticas por el agregado de *Lactobacillus plantarum* y compuestos prebióticos.

## **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Obtener un recubrimiento a ser aplicado sobre galletitas horneadas para prolongar la supervivencia de bacterias con características potencialmente probióticas.
- 2- Utilizar distintas formulaciones para el recubrimiento a base de hidrocoloides (almidón, alginato de calcio, etc.). Seleccionar las formulaciones más adecuadas a través de la determinación de la viabilidad de las bacterias una vez aplicadas a las galletitas.
- 3- Evaluar la viabilidad de las bacterias probióticas aplicadas a las galletitas por un sistema simulado del tracto gastrointestinal.
- 4- Caracterizar las galletitas funcionales con diversas metodologías, como textura, actividad acuosa, contenido de agua.
- 5- Evaluar la viabilidad de las bacterias probióticas durante el almacenamiento de las galletitas.

### **3.1 PREPARACIÓN DE LAS GALLETITAS**

#### **3.1.1 Ingredientes para la formulación**

En este trabajo, se emplearon los siguientes componentes para las formulaciones de las galletitas: tres clases de harina: harina de trigo tres ceros (Favorita, Molinos, Industria Argentina), harina de soja (Yin-Yang, Industria Argentina) y harina integral de trigo (Pureza, Cañuelas, Industria Argentina); aceite de girasol (Cocinero, Industria Argentina), sacarosa, cloruro de sodio, agua destilada, y leudantes químicos (relación 2:1 de fosfato ácido de disodio + bicarbonato ácido de sodio). La Tabla 2 muestra la composición de las harinas y la Tabla 3 la composición de la materia grasa agregada las cuales influyen directamente en la calidad alimentaria y las características macroscópicas del producto final.

Tabla 2: Composición de las harinas utilizadas.

| <b>Composición en</b><br>100 g | <b>Harina blanca 000</b><br>(Favorita) <sup>1</sup> | <b>Harina integral</b><br>(Pureza, Cañuelas) <sup>1</sup> | <b>Harina de soja</b><br>(Yin-Yang) <sup>1</sup> |
|--------------------------------|---|---|--|
| Calorías                       | 335 Kcal  | 304 Kcal  | 436 kcal.  |
| Lípidos                        | 1,5 g   | 2 g   | 20,6 g   |
| Sodio                          | 2 mg  | 8 mg  | 20mg   |
| Carbohidratos                  | 71 g  | 60,2 g  | 35,2g  |
| Proteínas                      | 10 g  | 11,4 g  | 34,5g  |
| Fibra alimentaria              | 3,4g  | 10,4 g  | 4,7g   |
| Potasio                        | 95 mg   | 502 mg  | ---  |
| Vitamina A                     | 0 UI  | 70 UI   | ---  |
| Vitamina E                     | ---   | 1,6 mg  | ---  |
| Vitamina B1                    | 0,4 mg  | 0,5 mg  | 0,58mg   |

|              |        |         |         |
|--------------|--------|---------|---------|
| Vitamina B2  | 0,1 mg | 0,14mg  | 1,16mg  |
| Vitamina B3  | 1,0 mg | 5,1 mg  | ---     |
| Niacina      | ---    | ---     | 4,32 mg |
| Vitamina B6  | ---    | 0,44 mg | 0,46 mg |
| Hierro       | 0,9 mg | 3.3 mg  | 6,37 mg |
| Calcio       | 16 mg  | 44 mg   | 206 mg  |
| Fósforo      | 95 mg  | 406 mg  | ---     |
| Acido fólico | ---    | ---     | ---     |
| Zinc         | ---    | ---     | 3,92g   |
| Agua         | ---    | ---     | 5,2 g   |

<sup>1</sup>Los valores indicados corresponden a los informados por los elaboradores.

Tabla 3: Composición del aceite de girasol.

| Composición                   | <b>Girasol</b> <sup>1</sup> 5ml |
|-------------------------------|---------------------------------|
| Valor energético              | 124,2 Kcal                      |
| Omega 6                       | ---                             |
| Omega 3                       | ---                             |
| Lípidos                       | 13,8 g                          |
| Acidos grasos saturados       | 1,2 g                           |
| Acidos grasos monoinsaturados | 3,6 g                           |
| Acidos grasos poliinsaturados | 8,4g                            |
| Vitamina E                    | 6,6mg                           |
| Colesterol                    | 0 mg                            |
| Fibra alimentaria             | 0g                              |
| Glúcidos                      | 0g                              |
| Proteínas                     | 0 g                             |
| Sodio                         | 0 mg                            |

<sup>1</sup>Los valores indicados corresponden a los informados por el elaborador.

Las masas se prepararon de acuerdo con la formulación:

Harina 100 g (100% harina de trigo o 50% harina de trigo integral y 50% harina de soja)

Sal fina 2 g (Dos Anclas, Hidalgo, Industria Argentina)

Sacarosa 15 g (Ledesma, Industria Argentina)

Bicarbonato de sodio 1,57 g (Anedra, Industria Argentina)

Fosfato ácido de disodio 3,65 g (Anedra, Industria Argentina)

Aceite de girasol 20 ml

Agua destilada 60 ml

### **3.1.2 Elaboración de la masa**

Se pesaron por separado todos los componentes secos de cada tipo de formulación, se homogeneizaron y luego se agregaron los ingredientes líquidos (aceite y agua destilada) y se amasó hasta formar una masa uniforme. Se dejaron reposar las masas 15 a 20 minutos, para después estirar cada una de ellas sobre una placa niveladora para obtener un espesor parejo. Luego las masas fueron cortadas con un molde circular y depositadas sobre bandejas de horno cubiertas con papel aluminio. Por último se procedió a generar un espacio en el centro de cada galletita con una varilla para contener la suspensión de probióticos y/o prebióticos y evitar pérdidas durante el posterior manipuleo.

### **3.1.3 Horneado**

Se estudiaron dos temperaturas de horneado: 140°C y 180°C, y por lo tanto dos tiempos de cocción, que fueron 45 minutos y 30 minutos respectivamente. Luego se procedió a evaluar ambas condiciones para elegir una de ellas para los estudios posteriores.

Para el proceso de horneado se utilizó un horno ARISTON modelo FM87-FC (Italia), el cual fue precalentado hasta alcanzar la temperatura de horneado antes de cada ensayo.

## **3.2 CARACTERIZACIÓN DE LAS GALLETITAS**

Para verificar que la temperatura y el tiempo de cocción seleccionados aseguren la cocción de las masas se realizó el test de gelatinización del almidón luego del horneado de las galletitas; ésto se evaluó mediante microscopia óptica. Las muestras previamente fueron molidas y maceradas con agua en un mortero y luego cada una de ellas se colocó en un portaobjetos y se observó a través de un microscopio Leica DMLB (Heerbrugg, Alemania), equipado con una cámara digital Leica DC 100 y con la que se obtuvieron las respectivas micrografías.

### **3.2.1 Determinación de color superficial**

El color de la harina depende fundamentalmente de la eficacia con que se limpie y del grado de refinado. El color adoptado por la masa estará ligado de forma directa al color de la harina. A su vez, el color de las masas no sólo depende de la coloración de la harina, sino que puede verse alterado por, tratamientos mecánicos de la masa e incorporación de distintos ingredientes y distintos métodos de horneado.

Para este ensayo se colocaron las galletitas sobre una superficie lisa y se midió directamente sobre las mismas con el colorímetro a temperatura ambiente. Se tomaron aproximadamente los valores de 10 muestras por condición (dos formulaciones y dos condiciones temperatura-tiempo). Los resultados fueron expresados como los valores medios de los parámetros.

El equipo se calibró siguiendo las instrucciones del fabricante, utilizando el patrón blanco que éste posee. Las mediciones de color se llevaron a cabo en forma cuantitativa con un colorímetro Minolta CR-400 (Minolta CR-400, Minolta Corp., Ramsey, New Jersey, EEUU). Este equipo es un analizador compacto triestímulo del color reflejado por superficies, con un cabezal de medida de 8 mm de diámetro y un procesador de datos DP-301 como se observa en la Fig. 2.



Fig. 2: Fotografía del colorímetro utilizado.

El color se describe a través de la luminosidad  $L^*$  y la cromaticidad por los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ . El parámetro  $L^*$  varía desde 100 para un blanco perfecto y 0 para el negro. El parámetro  $a^*$  representa el color rojo cuando es positivo, y verde cuando es negativo y  $b^*$  representa el color amarillo cuando es positivo, y azul cuando es negativo (Fig. 3). Se calcularon los valores de los parámetros  $L^*$  y  $a^*/b^*$ .

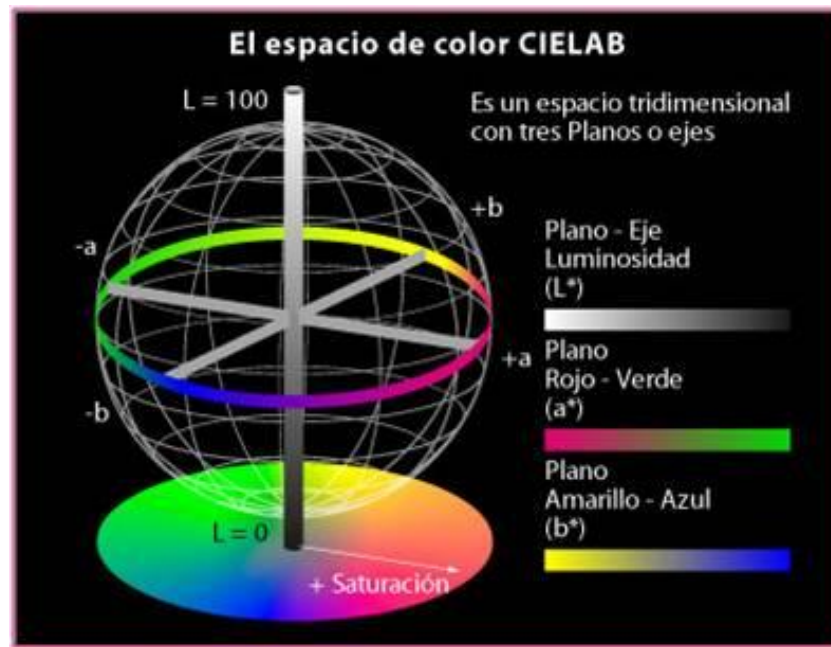


Fig. 3: Carta de color

### 3.2.2 Análisis de textura

La textura juega un papel muy importante en los productos derivados de harinas. Las masas al ser horneadas experimentan

cambios bioquímicos y fisicoquímicos. El producto final se caracteriza por su estructura y sus propiedades mecánicas, que determinan en parte su aceptación sensorial. Las propiedades mecánicas se miden como la reacción al esfuerzo.

El análisis de perfil de textura permite relacionar parámetros medibles instrumentalmente con lo que ocurre durante la masticación que tiene connotaciones sensoriales.

Para este ensayo se utilizó un analizador de Textura TA.XT2i (Stable Micro Systems, Reino Unido). El equipo está conectado a una computadora que permite el registro y análisis posterior de los datos (Fig. 5). La calibración del equipo se lleva a cabo por peso muerto con una pesa de 5 Kg.

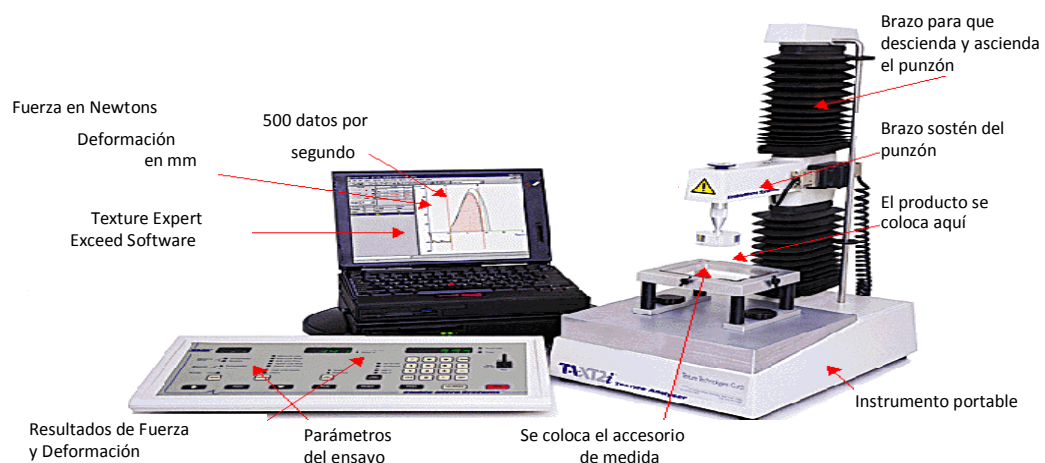


Fig. 5 Texturómetro TA. XT 2i.

Los parámetros del Análisis del Perfil de textura utilizados en todos los ensayos son los siguientes:

Velocidad pre-ensayo 1 mm /seg

Velocidad de ensayo : 0.5 mm /seg

Velocidad post ensayo: 1 mm /seg

Porcentaje de compresión: 60%

A partir de la fuerza máxima y la pendiente de las curvas se determinan los diferentes parámetros. La dureza se define físicamente como la fuerza máxima ejercida sobre la muestra. Sensorialmente es la fuerza requerida para penetrar la muestra con los dientes. La pendiente está relacionada con la fracturabilidad y crocancia.

En este ensayo se evaluaron las galletitas horneadas en el día. Se utilizaron 10 galletitas de cada variante, según el tipo de harina utilizada y condiciones de horneado. Se utilizó un soporte que consta de una placa metálica cuadrada que posee círculos concéntricos donde se coloca la muestra. Se utilizó una sonda de fractura de sección rectangular.

Se determinó la fuerza máxima de fractura (relacionada con la dureza) y la pendiente de la curva fuerza máxima-deformación, de la cual se obtiene información sobre la crocancia de la galletita.

El objetivo del análisis de textura, junto con el análisis de color superficial, consistió en caracterizar las galletitas para poder elegir las mejores condiciones de cocción.

### **3.3 PREPARACIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS**

Se estudiaron dos tipos de recubrimientos con y sin agregado de glicerol como plastificante, de los cuales luego se seleccionó el más apto para los objetivos propuestos.

#### **3.3.1 Recubrimiento de Alginato de Calcio**

Se preparó una solución de alginato de sodio al 2%, que se conservó a 4°C. Primero se hizo un ensayo con y sin glicerol al 3% con respecto al alginato; observando cómo se comportaba el recubrimiento luego del secado en estufa a 30°C durante 30-45 minutos sobre los dos tipos de galletitas.

Este ensayo se llevó a cabo pincelando la solución de alginato de sodio/alginato de sodio + glicerol sobre las galletitas y luego agregando con un pulverizador una solución de  $\text{CaCl}_2$  0,05 M.

#### **3.3.2 Recubrimiento de Almidón**

Se utilizó almidón de maíz (Maizena) como fuente de almidón. Se preparó una solución de almidón al 3% en un vaso de precipitados agitando con varilla de vidrio. Luego se colocó el vaso en baño termostático a 90°C durante 30 minutos para lograr una suspensión viscosa. Se dejó enfriar a temperatura



ambiente. A una parte de la suspensión se le agregó glicerol al 3% con respecto al almidón.

Se pincelaron las galletitas de las dos variedades con las soluciones y se llevaron a estufa a 30°C durante 30-45 minutos.

### **3.3.3 Evaluación de la integridad del recubrimiento**

Para evaluar la integridad del recubrimiento aplicado sobre las galletitas, se colocó una galletita en un soporte donde se realizaron observaciones con un estereomicroscopio (Leica MZ 10 F, Alemania), utilizando una lámpara como fuente de luz. Se tomaron fotografías de las observaciones con distintos aumentos (cámara adosada Leica DFC 490, Alemania) y se utilizó como colorante una solución de iodo-ioduro para denotar la presencia del recubrimiento de almidón.

### **3.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ACUOSA ( $a_w$ )**

La actividad acuosa se midió con un equipo AQUA LAB Versión 1.5 series 3 and 3TE (EEUU). El equipo utiliza la técnica de punto de rocío con espejo refrigerado. La muestra se deja equilibrar en una cámara. Esta cámara contiene el espejo y un sistema para detectar la condensación del vapor de agua sobre el espejo. En el equilibrio la humedad relativa en la cámara es igual a la actividad acuosa de la muestra. Este equipo controla la temperatura del espejo por un sistema termoeléctrico tipo Peltier. Un haz de luz es dirigido al espejo y su reflexión es captada por un fotodetector, el cual registra los cambios de reflexión cuando ocurre la condensación. La temperatura a la que esto ocurre es registrada por una termocupla adosada al espejo. El aparato cuenta con un ventilador interno que favorece el establecimiento del equilibrio rápidamente. La calibración se realizó con soluciones de sales de humedad conocida.

### **3.5 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD**

Para determinar la humedad de las galletitas, se midió la pérdida

de peso que sufre la muestra, por evaporación de agua. Para el ensayo se colocaron, en una cápsula previamente pesada, 5 g de galletita, y se ubicaron en la estufa a 105 °C hasta peso constante. Una vez retirada la cápsula de la estufa, se pesaron y se determinó la cantidad de agua evaporada calculando la pérdida de peso. El contenido de humedad porcentual en base seca se calculó según:

Ec. 1

H (%): Contenido porcentual de humedad

P<sub>i</sub>: Peso inicial de la muestra.

P<sub>f</sub>: Peso final de la muestra.

### **3.6 PREPARACIÓN DE LAS GALLETITAS CON EL AGREGADO DE COMPUESTOS ACTIVOS POTENCIALMENTE PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS**

#### **3.6.1 Cultivo bacteriano**

Se utilizó la cepa *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114, perteneciente al cepario del Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA).

#### **3.6.2 Activación, mantenimiento y preparación del cultivo**

El cultivo de *L. plantarum* se reactivó usando un inóculo (1% v/v) en caldo MRS durante 20-24 hs a 30°C. Se realizaron repiques cada 15 días para mantener el cultivo fresco y se lo conservó en cámara a 0°C. Para el ensayo, se inoculó este cultivo en caldo MRS (1% v/v), incubándose a 30°C durante 15-16 hs, a fin de obtener una concentración de aproximadamente 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml).

Para trabajar con el cultivo luego se tomaron fracciones de 1 ml de suspensión bacteriana y se colocaron en eppendorfs de 1,5 ml. Se centrifugaron aproximadamente a 20.400g durante 5 min y se descartaron los sobrenadantes. Luego se resuspendieron los pellets en 0,1 ml de caldo MRS y se agitaron en vortex. Por último se colocó el contenido de cada eppendorf sobre una galletita, utilizando una pipeta automática y haciendo que el

volumen de suspensión bacteriana quedara contenido en la depresión generada en la galletita antes de la cocción para tal fin.

### 3.6.3 Agregado de inulina y trehalosa

La inulina utilizada en este trabajo es la Frutafit®-inulin, producida por una empresa azucarera de Holanda. La Tabla 4 ejemplifica las especificaciones tanto fisicoquímicas como microbiológicas de la inulina comercial utilizada.

Tabla 4: Especificaciones de la inulina

| Tipo de Fibra                    |                    | Inulina                                       |
|----------------------------------|--------------------|---|
| Apariencia                       |                    | Polvo Libre de<br>Puntos Negros               |
| Color                            |                    | Blanco  |
| Olor                             |                    | Inodora                                       |
| Sabor                            |                    | Neutro Ligeramente. Dulce                     |
| Cont. de Fibra Soluble           |                    | > 90 %  |
| Contenido de Fibra Insoluble     |                    | ≤ 10 %  |
| PH                               |                    | Neutro  |
| (En suspensión. acuosa. al 10 %) |                    |   |
| Retención de Agua                |                    | ≤ 5 g H <sub>2</sub> O/g de materia seca      |
| Tamaño de Partícula              |                    | < 85μ entre el 10 y 80 % de las<br>partículas |
| Metales Pesados                  |                    | No Contiene                                   |
| Análisis<br>Microbiol            | Recuento total     | Max. 10 <sup>3</sup> ufc/ g                   |
|                                  | Hongos y levaduras | Max. 20 ufc/ g                                |

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| <i>E. coli</i>                | Negativo |
| <i>Salmonella</i> sp. en 25 g | Negativo |

Se pesó inulina para alcanzar una concentración de 2 % (p/v) en una balanza analítica, y luego se agregó la misma a un tubo de caldo MRS esterilizado. Se homogeneizó en un vortex durante 2 minutos.

La trehalosa utilizada fue Trehalosa Becton Dickinson (Sparks, USA). Se pesó la trehalosa para alcanzar una concentración del 10% y luego fue agregada al tubo con caldo MRS esterilizado previamente adicionado con inulina. Se homogeneizó en vortex durante 3 minutos aproximadamente. Se tomaron 0,1 ml del MRS+inulina+trehalosa para resuspender los pellets de *L. plantarum*.

### **3.7 RECuento BACTERIANO EN AGAR-MRS**

Para determinar la concentración de microorganismos viables, se utilizó el método de recuento en placa. Para ello se realizaron las diluciones seriadas correspondientes de las muestras en la solución de triptona al 0,1% p/v. Luego se tomó una muestra de 0,1ml de las diluciones y se inocularon en placas de Petri con agar MRS. Se colocaron 4 ó 5 perlas de vidrio estériles y se agitaron suavemente durante 1 minuto para distribuir la muestra. Las perlas fueron retiradas y las placas así sembradas se colocaron en estufa a 30°C. A las 24 hs se realizó el recuento de las colonias.

Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml).

### **3.8 VIABILIDAD *IN VITRO* DE LAS BACTERIAS SOBRE LAS GALLETITAS**

Se analizó el efecto secuencial en un sistema simulado del estómago y del intestino sobre las bacterias adheridas a la superficie de las galletitas.

Se colocaron 10g de galletitas en una bolsa plástica para Stomacher y 40 ml de una solución de triptona al 0,1%. Se homogeneizó la mezcla en el Stomacher (Seward Laboratory Blender, Stomacher 400) durante 90 segundos. Luego se transfirieron 5 ml a un Erlenmeyer, al cual se le agregaron 5 ml de HCl (pH 1,8 simulante gástrico) y se lo incubó durante 3 hs a 37°C en un agitador orbital. Transcurrido ese tiempo, se transfirió una alícuota de la solución de 4 ml a 4 ml de sales biliares al 0,6% (pH 7,4, 2 hs simulante intestinal) a 37°C en un agitador orbital; y una alícuota de 4 ml sobre 4 ml de una solución buffer fosfato pH 7, 2 hs a 37°C en un agitador orbital.

Después de la digestión se tomó una alícuota para obtener diluciones seriadas para realizar los recuentos de bacterias viables. Los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

En cada ensayo se realizó un control para determinar el título de bacterias adheridas a la superficie de las galletitas. El control se llevó a cabo colocando 10g de galletitas en una bolsa plástica para Stomacher y 40 ml de una solución de triptona al 0,1%. Se homogeneizó la mezcla en el Stomacher durante 90 segundos y se tomó una alícuota de la solución, realizando las diluciones seriadas y los correspondientes recuentos en placa.

### **3.9 VIABILIDAD DE LAS BACTERIAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO**

Se estudió también la viabilidad de las bacterias sobre las galletitas durante el almacenamiento en cámara a 20°C. Para esto se utilizaron 3 batches de galletitas con bacterias:

- control, sólo con bacterias
- con bacterias + recubrimiento de almidón y glicerol
- con bacterias + trehalosa e inulina. + recubrimiento de almidón y glicerol.

En todos los casos se tomó una muestra inicial para hacer recuento, y luego se fueron tomando muestras periódicamente para poder analizar la viabilidad en cada caso a lo largo del tiempo.

También se analizó el efecto de la digestión *in vitro* para galletitas con bacterias + recubrimiento de almidón y glicerol + trehalosa e inulina luego de 22 días de almacenamiento.

Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

### **3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos se trataron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANAVA) y las medias fueron comparadas mediante el Test de Tuckey y Test de Fisher (LSD).

## **ANEXO: PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES**

### **1. Caldo MRS**

Se utilizó caldo MRS (Biokar Diagnostics, Francia) cuya composición se detalla en el Tabla 5. Para la preparación del mismo, se pesaron 55,3 g del caldo en balanza granataria (Ohaus, EEUU) y se agregó 1 l de agua destilada, con agitación hasta total disolución. El pH de la solución resultante se midió en un peachímetro (Cole-Parmer, EEUU) siendo el valor 6,92. Se fraccionó en tubos de ensayo de 10 ml para ser utilizados en los repiques.

Tabla 5: Composición del caldo MRS

| Compuesto  | Concentración g/l |
|--|-------------------|
| Polipectona  | 10                |
| Extracto de carne                                    | 10                |
| Extracto de levadura                                 | 5                 |
| D (+) glucosa  | 20                |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                      | 2                 |
| Tween 80   | 1, 08             |
| Citrato de amonio                                    | 2                 |
| Acetato de sodio                                     | 5                 |
| MgSO <sub>4</sub>                                    | 0, 2              |
| MnSO <sub>4</sub>                                    | 0,05              |
| <b><u>Fuente :De Man, Rogosa y Sharpe (1960)</u></b> |                   |

### **2. Agar-MRS**

Se pesaron 68,3 g de agar MRS (Britania, Argentina) en balanza granataria y se colocaron en una botella a la cual se le agregó 1 l de agua destilada, agitando manualmente para homogenizar la mezcla. Una vez esterilizado el agar MRS se dejó enfriar hasta 40°C y se colocó 12-15 ml en placas de Petri estériles. Se dejaron enfriar las placas a temperatura ambiente y luego se secaron en estufa a 37°C durante 20 minutos aproximadamente. Cumplido este tiempo se colocaron en bolsas cerradas en heladera hasta su utilización.

### **3. Solución de triptona**

Se preparó una solución de triptona (Britania, Argentina) al 0,1 % (p/v) en agua destilada. Se prepararon tubos con 4,5 ml de la solución a fin de ser utilizados en las diluciones seriadas de las muestras.

### **4. Soluciones para la simulación de la digestión**

Se prepararon soluciones de ácido clorhídrico pH 1,8; sales biliares (Bilis de Buey Britania, Argentina) al 0,6% y buffer fosfato de sodio pH=7. El resto de los reactivos fueron de grado analítico.

### **5. Esterilización en autoclave**

Las soluciones de triptona al 0,1%, buffer fosfato de sodio, materiales de vidrio y espátulas fueron esterilizados en autoclave a 121°C a 1 atmósfera de sobrepresión, durante 15 minutos.



## 1. CONDICIONES DE HORNEADO

En el presente trabajo se ensayaron dos condiciones de horneado: 140°C durante 45 minutos y 180°C durante 30 minutos. En trabajos realizados previamente en el laboratorio (Bruno, 2009), utilizando el mismo horno, se determinaron las historias térmicas para ambas formulaciones.

Cuando se trata de alimentación animal, un parámetro relevante es asegurar la gelatinización completa del almidón para evitar problemas digestivos. Ambas condiciones de horneado cumplieron con este requisito, como se ejemplifica para el caso de la condición 140°C- 45 minutos. La Fig. 6 muestra la diferencia de tamaño de los gránulos de almidón antes y después del proceso de horneado. Utilizando luz polarizada en el microscopio se observó la pérdida de birrefringencia de los gránulos luego del horneado. Esto confirmó que las condiciones utilizadas condujeron a la gelatinización completa del almidón.

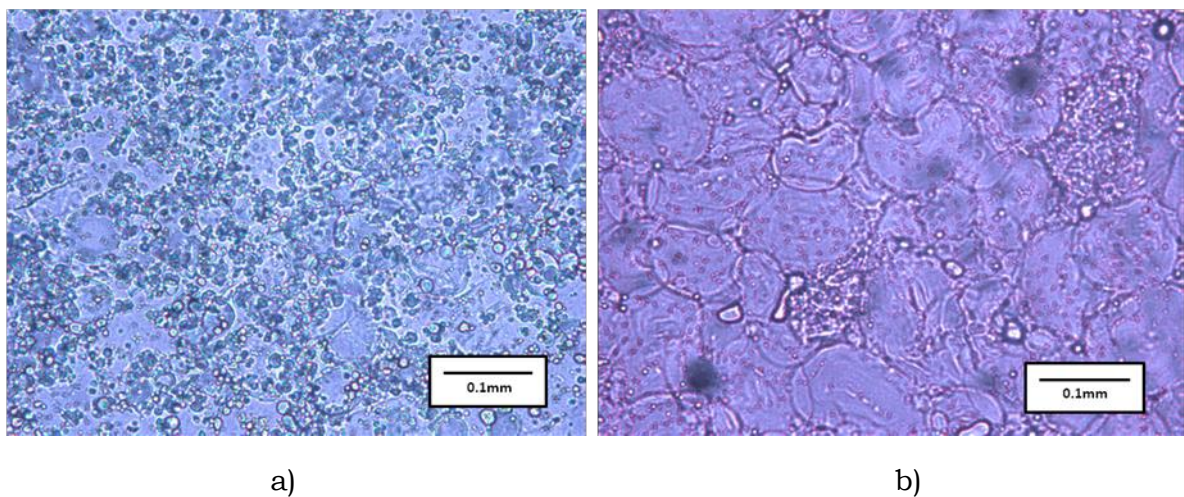


Fig. 6: Micrografías de galletitas de harina de trigo

a) Masa cruda

b) Masa horneada a 140°C durante 45 minutos.

Entonces, para seleccionar una de ambas condiciones se tomaron en cuenta color y textura de las galletitas horneadas. La observación macroscópica muestra que ambas condiciones tienen color y textura aceptables para el producto deseado (Fig. 7).

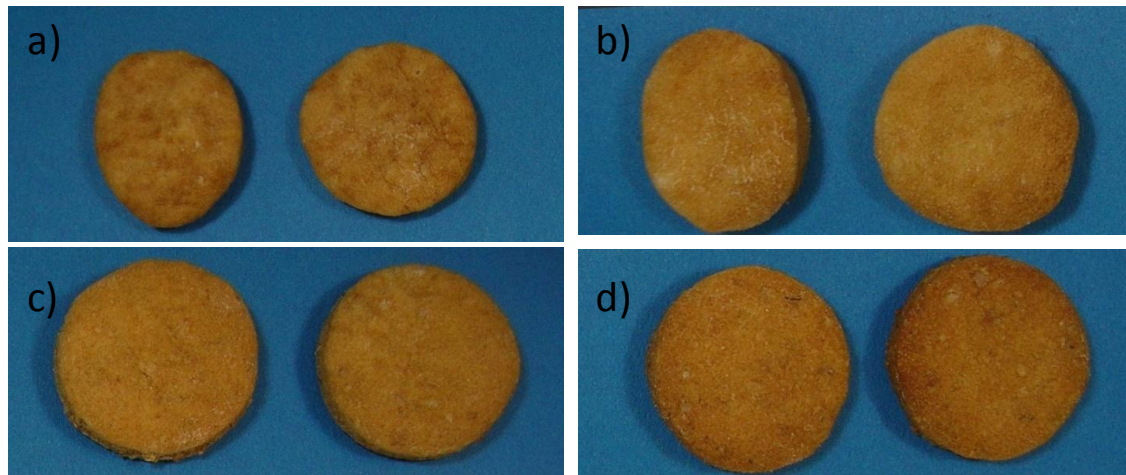


Fig. 7: Fotografías de galletitas recién horneadas.

- a) Galletitas de harina de trigo horneadas a 140°C durante 45 min.
- b) Galletitas de harina de trigo horneadas a 180°C durante 30 min.
- c) Galletitas de harina integral de trigo y harina de soja horneadas a 140°C durante 45 min.
- d) Galletitas de harina integral de trigo y harina de soja horneadas a 180°C durante 30 min.

A través del análisis del color superficial en forma instrumental no se observaron diferencias notorias entre los valores de luminosidad (Fig. 8 a y b). En el caso de las galletitas de trigo horneadas a 180°C durante 30 min se observó mayor  $L^*$  y menor  $a^*/b^*$  respecto a la otra condición de horneado, lo que indicaría un menor grado de cocción. En cuanto a las galletitas de harina de soja y harina integral de trigo a 180°C se alcanzaron mayores valores de  $a^*/b^*$  ya que por su composición en harinas poseen mayores cantidades de proteína que favorecen las reacciones de Maillard y por lo tanto de tonalidad tostada. Esto coincide con los valores de  $L^*$  obtenidos para este caso.

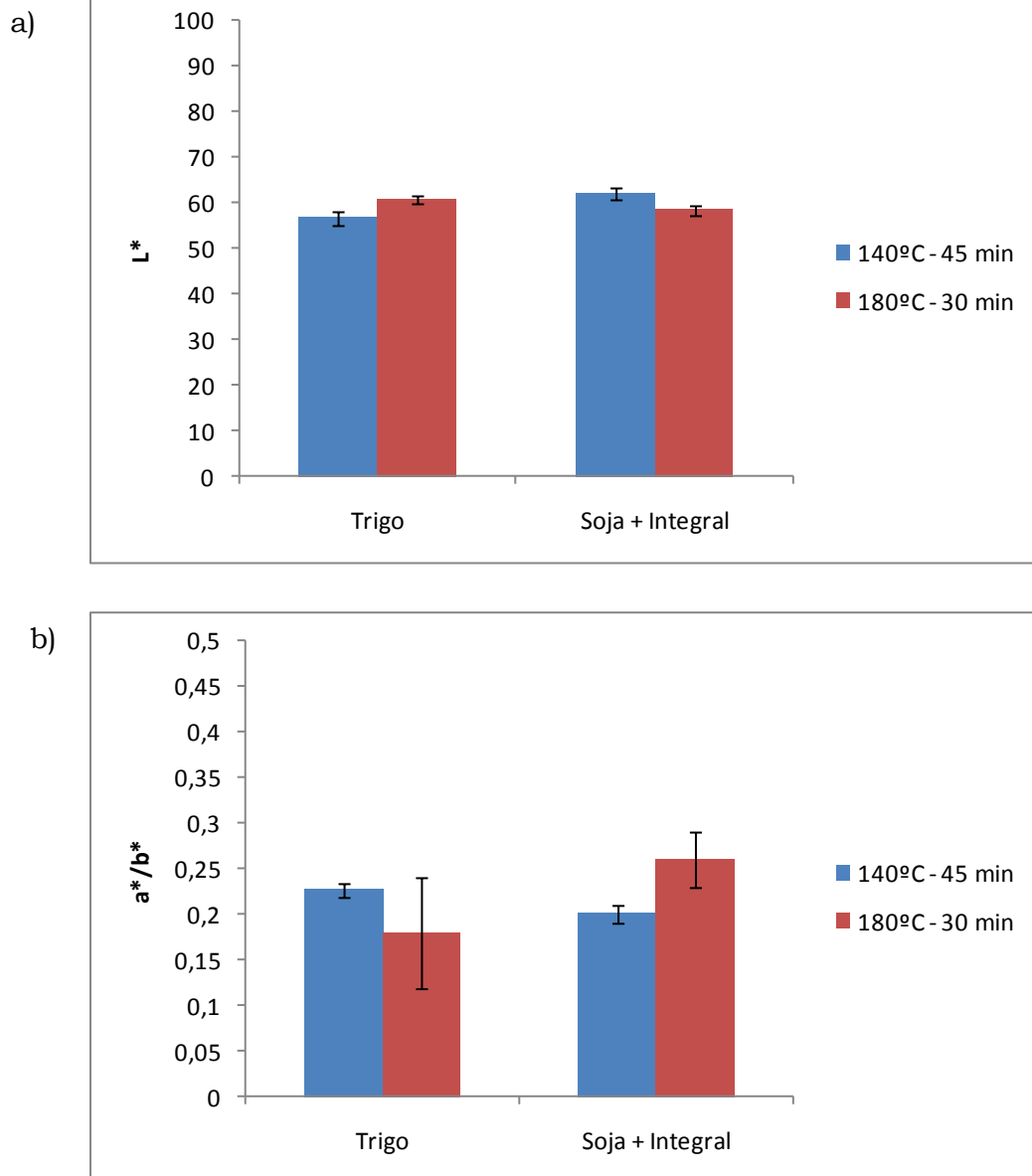


Fig. 8: Efecto de las distintas condiciones de horneado sobre las galletitas.

a) Parámetro de luminosidad ( $L^*$ )

b) Parámetros de cromaticidad ( $a^*/b^*$ )

Por lo general el análisis sensorial es el más adecuado para la selección de productos y se complementa con los ensayos instrumentales. Sin embargo, por la dificultad y costos asociados a la realización de ensayos sensoriales con animales, los ensayos instrumentales son una buena aproximación a la hora de elegir las condiciones de elaboración de un producto.

El análisis de textura se realizó con la intención de seleccionar las condiciones de horneado tales que los productos resultaran crocantes y duros ya que van a ser destinados a cánidos domésticos.

La Fig. 9 muestra perfiles fuerza-deformación típicos de las dos formulaciones de galletitas bajo las dos condiciones de horneado. Los perfiles correspondientes a 140°C-45 min indican una estructura más rígida y quebradiza a diferencia de los perfiles más plásticos, más deformables (mayor tiempo) correspondientes a 180°C-30 min.

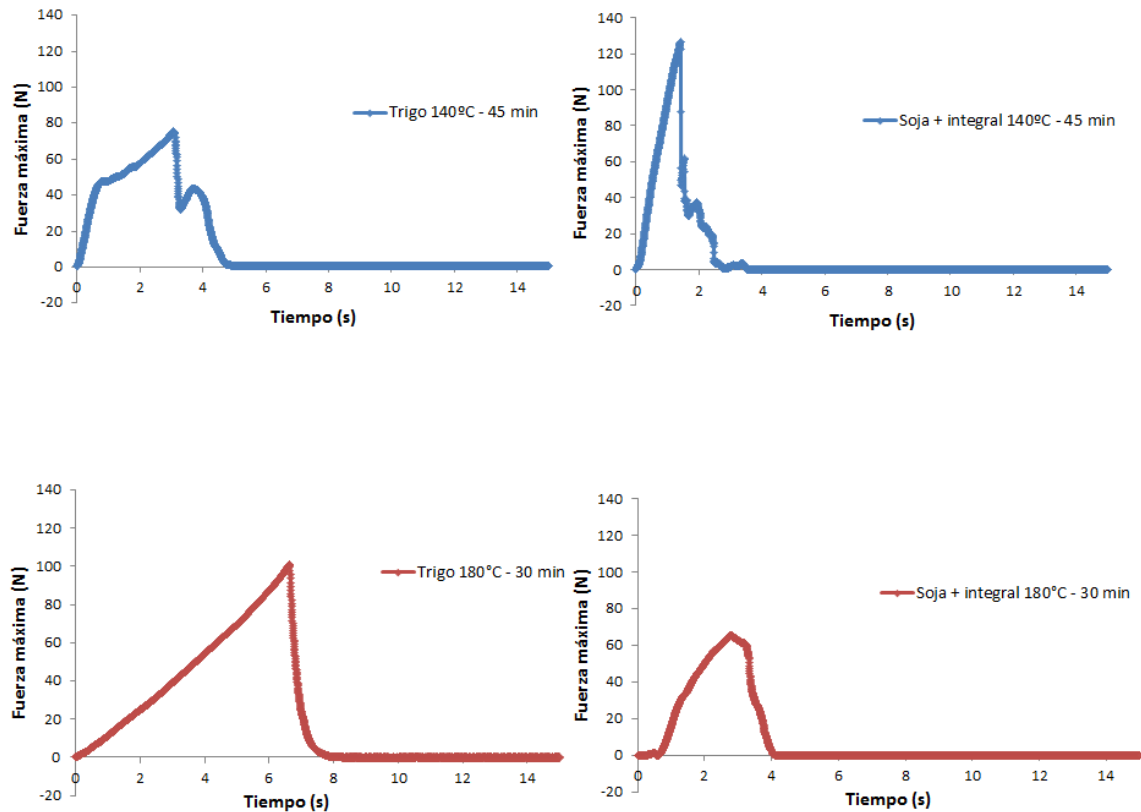
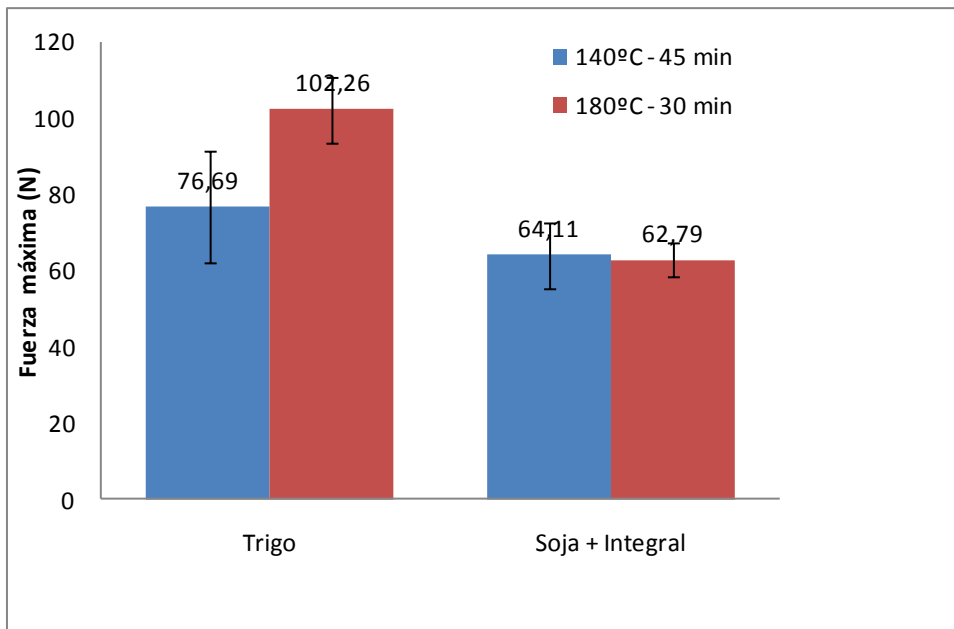


Fig. 9: Perfiles de textura para las galletitas en ambas condiciones de horneado.

Esto se evidenció al analizar la fuerza máxima y la pendiente inicial de las curvas. En el caso de las galletitas de harina de trigo, la mayor fuerza máxima de fractura obtenida a 180°C junto con la menor pendiente respecto a 140°C, podría indicar la formación de una costra y un interior más elástico (Fig. 10 a y b). Estos resultados estarían en concordancia con el menor grado de cocción señalado a través del parámetro de color superficial.

a)



b)

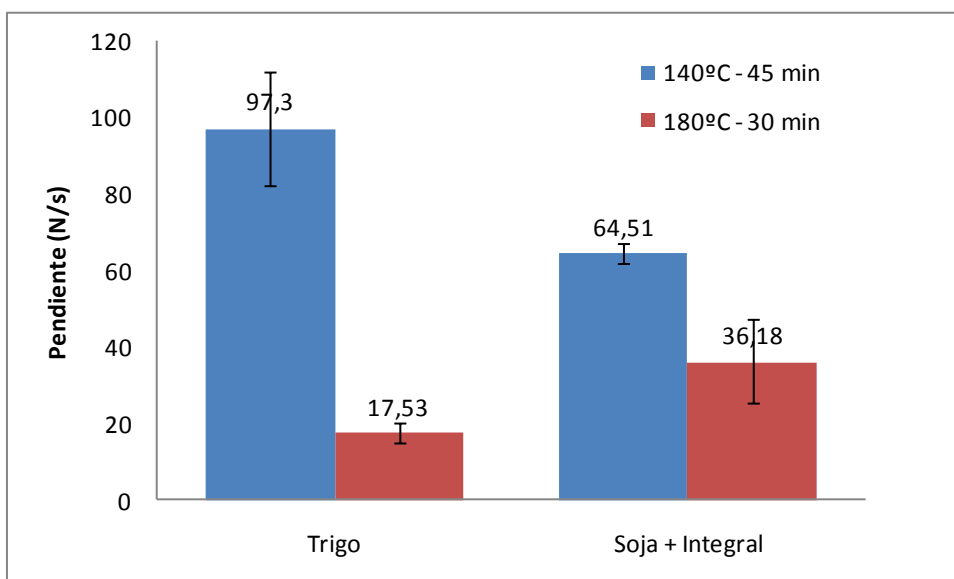


Fig. 10: Efecto de las condiciones de horneado sobre la textura de galletitas a base de harina de trigo 000 y harina de soja + harina integral de trigo.

a) Fuerza máxima

b) Pendiente

Sin embargo en el caso de las galletitas de harina integral de trigo y harina de soja, la diferencia entre los valores de fuerza máxima y de la pendiente resultaron menos marcados entre ambas condiciones de cocción, señalando la influencia del tipo de formulación frente al horneado.

Los ANAVA realizados para la fuerza máxima y para la pendiente, reflejaron que tanto el tipo de harina como las condiciones de horneado eran

factores significativos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, cuando se realizó la comparación de medias por el test de Fisher (LSD) para la fuerza máxima se observó que las muestras de harina integral de trigo + harina de soja bajo las dos condiciones de horneado no eran significativamente diferentes, como puede observarse en la Fig. 10 a.

De acuerdo con estos resultados, varios investigadores que estudiaron la crocancia de galletitas y otros productos tipo snack con métodos instrumentales hallaron que dentro de los parámetros obtenidos de la curva fuerza-deformación, la pendiente era el mejor indicador de la crocancia (Katz y Labuza, 1981).

El distinto comportamiento de las masas frente a la cocción estaría asociado al tipo de harina utilizado, ya que bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura las masas de harina de trigo alcanzaban una temperatura en el centro térmico superior a la registrada para las masas de harina integral y harina de soja (Bruno, 2009).

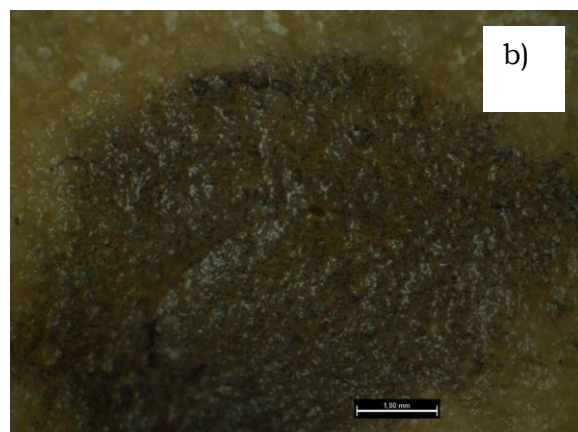
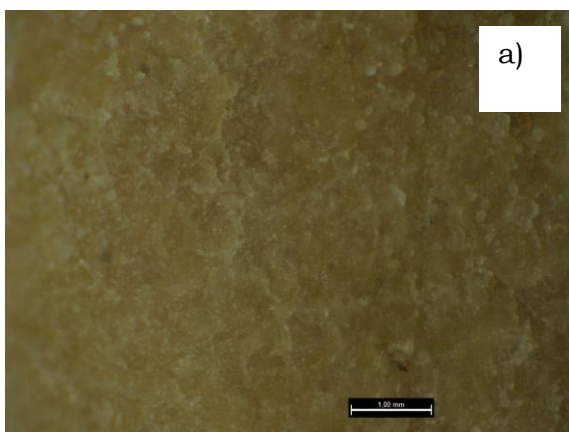
A partir de la premisa de seleccionar la condición que aportara mayor dureza y crocancia, se seleccionó la condición de horneado de 140°C durante 45 min.

## **2. SELECCIÓN DE LOS RECUBRIMIENTOS**

Con el fin de seleccionar el recubrimiento que preservara el mayor título de bacterias viables luego del tratamiento de la digestión *in vitro* se ensayaron las formulaciones de alginato de calcio y almidón, con y sin glicerol. La técnica de obtención del recubrimiento de alginato de calcio se realizó pulverizando una solución de  $\text{CaCl}_2$  sobre el alginato de sodio previamente pincelado sobre las muestras, lo que permitió la formación instantánea de un gel sobre las galletitas. Sriamornsak y Kennedy (2008) también utilizaron la técnica de pulverización de  $\text{CaCl}_2$  para obtener recubrimientos de alginato de calcio.

Para disminuir el número de ensayos se seleccionaron por observación directa una formulación de cada tipo de hidrato de carbono. Para el caso de las formulaciones de alginato, no se observaron diferencias en la integridad del sistema de protección, por lo que se optó por el recubrimiento sin glicerol. Para el recubrimiento a base de almidón, se seleccionó la formulación con glicerol ya que le otorgó mayor flexibilidad a la película formada. La Fig. 11

muestra la superficie de las galletitas con recubrimiento de almidón y glicerol. Las Fig. 11 b) y d) contienen una tinción de iodo-ioduro para resaltar la presencia del recubrimiento.



c)

d)

Fig. 11: Micrografías de galletitas con recubrimiento de almidón con glicerol.

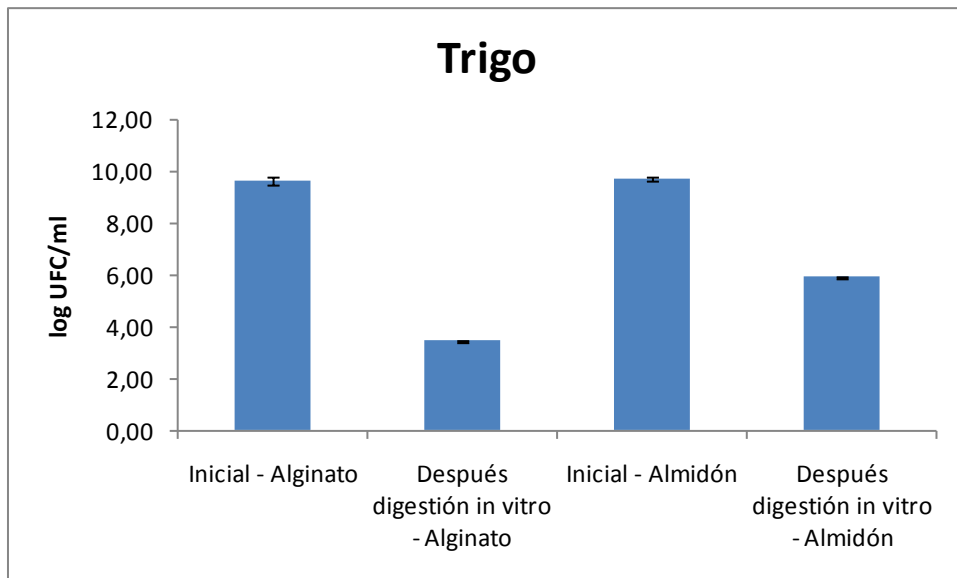
- a) de trigo, escala corresponde a 1 mm.
- b) de trigo con tinción de iodo- ioduro, escala corresponde a 1 mm.
- c) de trigo integral y soja, escala corresponde a 1 mm.
- d) de trigo integral y soja con tinción de iodo-ioduro, escala corresponde a 2 mm.

En la Fig. 12 a y b, se compara el recuento inicial y después de la digestión simulada tanto en galletitas de trigo como en galletitas de trigo integral y soja. Se puede observar que el recubrimiento a base de almidón sólo disminuyó 4 órdenes de magnitud las UFC/ml, mientras que con el recubrimiento de alginato de calcio la disminución fue de aproximadamente 6 órdenes de magnitud para las galletitas de trigo. En el mismo sentido, para las galletitas de harina de soja y harina integral de trigo el recubrimiento que reflejó el mayor número de colonias viables fue el de almidón con glicerol. Sin embargo, en esta última formulación de galletitas el efecto fue menos notorio.

A partir de estos resultados se seleccionó el recubrimiento a base de almidón para los demás ensayos.



a)



b)

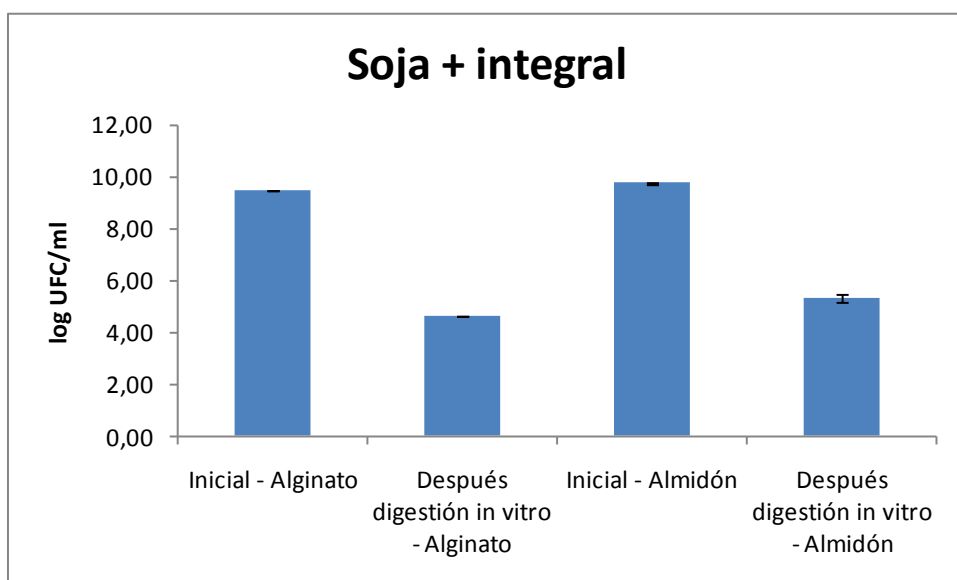


Fig. 12: Efecto del tipo de recubrimiento aplicado a las galletitas sobre el recuento de colonias de *L. plantarum* antes y después de la digestión *in vitro*.

a) Galletitas de harina de trigo 000.

b) Galletitas de harina de soja y harina integral de trigo.

### **3. EFECTO DEL RECUBRIMIENTO SOBRE LA VIABILIDAD DE *L. PLANTARUM* EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL**

Para que las bacterias tengan efecto probiótico se recomienda una dosis de al menos  $10^7$  UFC/ml al momento de su consumo (Shah, 2000).

Conociendo por estudios previos la relación entre la densidad óptica (DO) a 550 nm y el recuento en placa (UFC/ml) para *L. plantarum* (Bruno, 2009), en el presente trabajo se comprobó que luego de 15 hs de incubación a 30°C el recuento de UFC/ml de *L. plantarum* era aproximadamente 10<sup>9</sup>. Se tomaron los recaudos para que el volumen depositado sobre cada galletita no se derramara.

Tratándose de un sustrato que debe ser sometido a altas temperaturas antes del agregado de las bacterias, se trabajó con recubrimientos que facilitarían la adhesión sobre las galletitas. La protección de estos microorganismos benéficos es necesaria dadas las condiciones adversas a las que serán sometidos a lo largo del tracto gastrointestinal.

El pH del jugo gástrico varía de 1,1 a 2 para cánidos domésticos, pero el alimento ingerido tiene una capacidad buffer que puede temporalmente aumentar el pH del estómago y proteger a las bacterias de la exposición a valores de pH extremos. En cuanto a la concentración de sales biliares, varía con la secreción biliar y las diferentes regiones del intestino, dependiendo principalmente del tipo de alimento consumido, por lo que es difícil predecir la concentración de bilis en el intestino en un momento determinado (Lankankaputhra y Shah, 1995). Las concentraciones usadas para simular el sistema intestinal varían de 0,5 a 2%, siendo la concentración más utilizada 0,6% (Lee y Heo, 2000; Krasaekoopt y col., 2004). Con respecto a los tiempos de exposición a los tratamientos con HCl se ha encontrado diversidad en los mismos. Se decidió utilizar 3 horas, para realizar el ensayo bajo una condición más exigente, y 2 hs para simular el tránsito en el intestino (FAO-WHO, 2002).

Otros sistemas *in vitro* utilizan HCl como simulante gástrico y buffer fosfato (pH 7,4) como simulante intestinal (Chen y Subirade, 2006; Yuksel y col., 2000; George y Abraham, 2006). Los resultados pueden depender del sistema utilizado, y deberían contrastarse a futuro con sistemas *in vivo*, debido a que las condiciones reales son más complejas y no siempre la extrapolación es correcta (Martins y col., 2008).

Las colonias observadas fueron siempre redondas, blancas, brillosas y convexas, características de *L. plantarum* (Fig. 13).

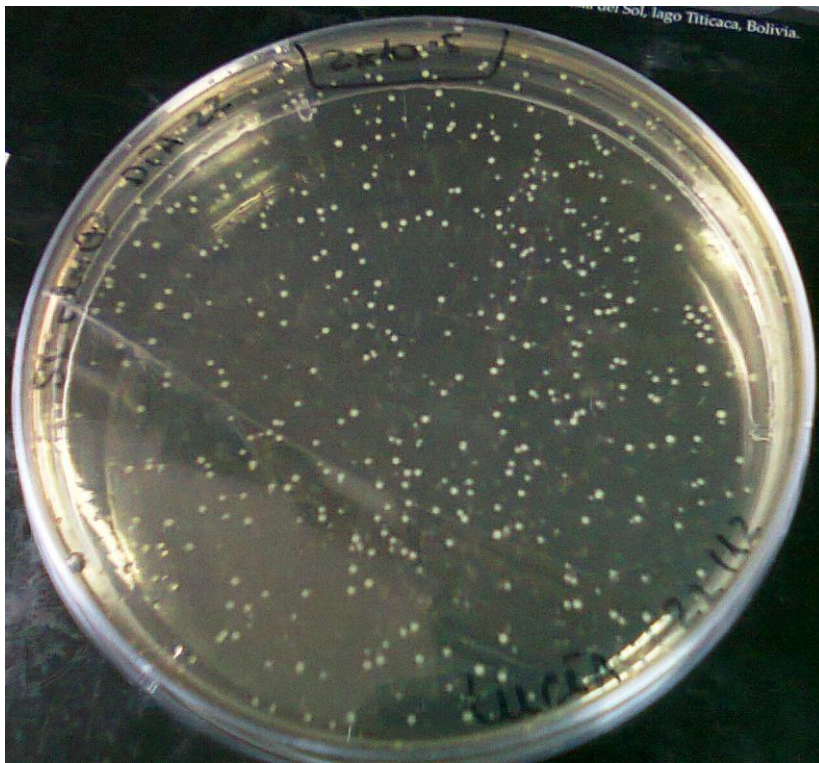


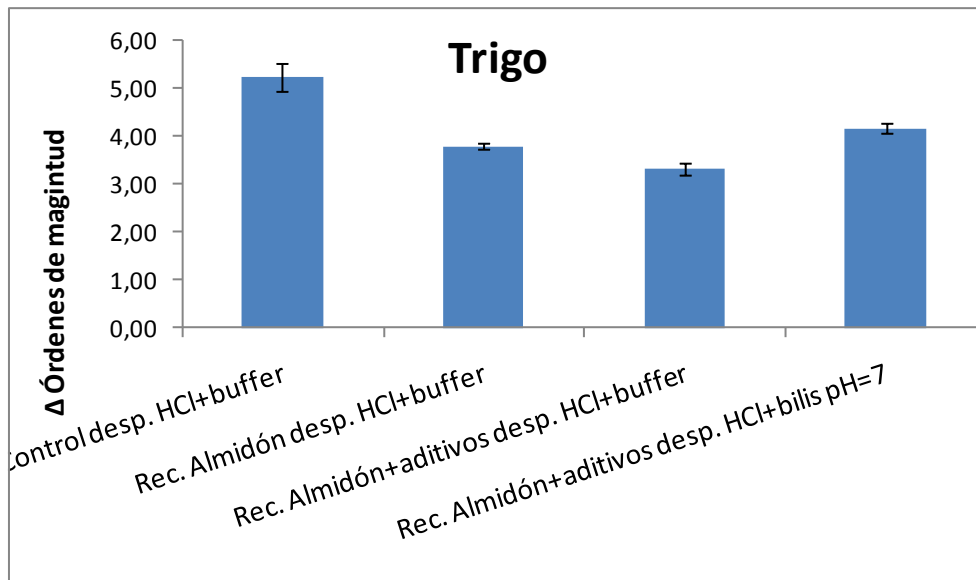
Fig. 13: Crecimiento de *L. plantarum* en agar-MRS.

Siendo el logaritmo del recuento inicial de aproximadamente 9 en todos los ensayos, la disminución de recuentos ( $\Delta$  Órdenes de magnitud, Ec. 2) debido a cada tratamiento se observa en la Fig. 14 a y b. Un mayor valor en el  $\Delta$  de órdenes de magnitud indica una mayor pérdida de bacterias debido al sistema gastrointestinal simulado.

$$\Delta \text{ Órdenes de magnitud (UFC/ml)} = \log (\text{UFC/ml}) \text{ inicial} - \log (\text{UFC/ml}) \text{ después digestión } in vitro$$

Ec. 2

a)



b)

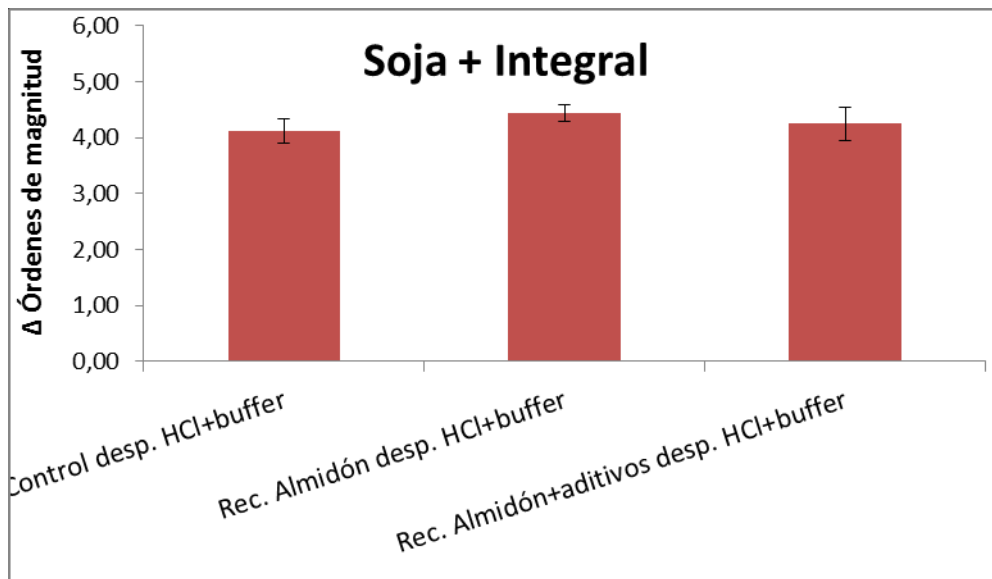


Fig. 14: Efecto de los tratamientos de digestión *in vitro* para las galletitas

a) galletitas de harina de trigo

b) galletitas de harina de trigo integral y soja

En el caso de las galletitas de trigo (Fig. 14 a), la presencia de recubrimiento resultó siempre favorable, manteniendo un recuento entre 1 y 2 órdenes de magnitud superior respecto al control. El mejor resultado se obtuvo con la presencia del recubrimiento de almidón y la adición de trehalosa al 10% e inulina al 2% a las bacterias en la simulación con HCl + buffer.

No se obtuvieron recuentos cuando el sistema *in vitro* utilizado fue HCl + bilis. El sistema HCl + bilis con pH ajustado a 7 permitió obtener el recuento señalado en la Fig. 14 a. La diferencia entre estos sistemas con bilis, radicaría en la corrección del pH luego del pasaje por HCl para este sistema experimental, ya que en el primer caso el erlenmeyer conteniendo la bilis con las bacterias presentaba un pH de aproximadamente 1,8 por la presencia residual del HCl utilizado como simulante gástrico. En este sistema simulado, las pérdidas de colonias viables fueron mayores que para el sistema HCl + buffer, incluso utilizando el recubrimiento y los aditivos inulina y trehalosa. Esto muestra la dificultad de comparación con datos bibliográficos dada la diversidad de sistemas simulados utilizados por diversos autores. En futuros ensayos se debería contar con un sistema que incluya bilis con un buffer adecuado.

Para el caso de las galletitas de harina integral de trigo y soja no hubo diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) en los recuentos con y sin recubrimiento, ni tampoco con el agregado de inulina y trehalosa.

La pérdida de bacterias depende también del sustrato donde éstas son aplicadas, ya que las galletitas sin recubrimiento de trigo perdieron 5 órdenes (Fig. 14 a) y las de integral de trigo y soja un orden menos (Fig. 14 b). Este último sustrato tendría un efecto protector por sí mismo, opacando el posible efecto del recubrimiento.

#### 4. EFECTO DEL ALMACENAMIENTO SOBRE EL PRODUCTO

La textura es un parámetro que aporta al conocimiento de la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento. Con el fin de evaluar las modificaciones de textura durante un mes de almacenamiento a 20°C, se simularon las condiciones del producto agregando a las galletitas solamente el recubrimiento y 0,1 ml de caldo MRS (Fig. 15 a y b).

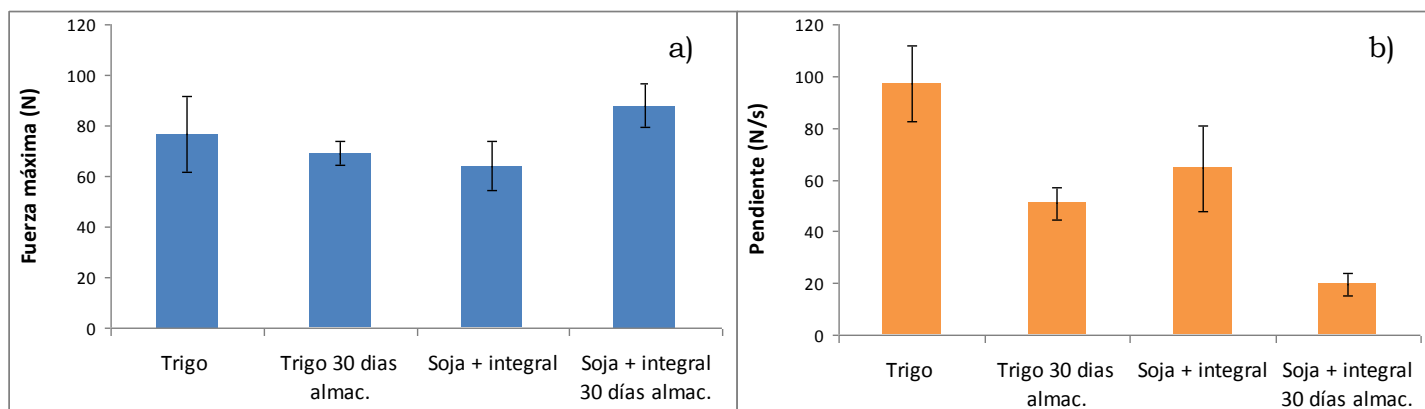


Fig. 15: Efecto del almacenamiento sobre los parámetros de textura de galletitas de harina de trigo (Trigo) y galletitas de harinas de trigo integral y soja (Soja + Integral).

a) Fuerza máxima (N)

b) Pendiente ( N/s) de la curva fuerza vs. tiempo

La fuerza máxima asociada a la dureza de este producto no presentó diferencias significativas respecto al tiempo de almacenamiento, ni al tipo de formulación. Sin embargo, el almacenamiento resultó un factor significativo ( $p < 0,05$ ) para la pendiente; al disminuir este valor, estaríamos en presencia de un producto de menor crocancia.

La actividad acuosa a los 30 días de almacenamiento a 20°C, fue para las galletitas de trigo de 0,59 y para las galletitas de trigo integral y soja de 0,60, valores que no difirieron de los iniciales. Estos valores de la  $a_w$  son suficientemente bajos para evitar el desarrollo microbiano excepto ciertos hongos y levaduras, y otorgar alta estabilidad frente a las reacciones de deterioro mediadas por el agua (Fennema, 2000).

El contenido de agua determinado luego del almacenamiento fue de 11,26% para las galletitas de trigo y 11,30% para las galletitas de trigo integral y soja (ambos datos en base seca), valores que están de acuerdo con el CAA, que señala un valor máximo de 12% para galletas y bizcochos en el artículo 766.

La humedad relativa del alimento tiende a equilibrarse con la humedad relativa ambiente y si esta última es excesiva se favorecerá el desarrollo de microorganismos indeseables. Esto debe tenerse en cuenta al decidir los materiales de envasado y condiciones para el almacenamiento para no perjudicar los logros obtenidos durante el procesamiento del producto (Morris y Orford, 1987).

Respecto a la disminución de la viabilidad de la cepa estudiada durante el almacenamiento, se observó en las galletitas control sin recubrimiento que las formulaciones de harina de trigo disminuían casi 3 órdenes de magnitud a las 20 días de almacenamiento respecto al título inicial (Fig. 16 a), mientras que en las galletitas con mezcla de harinas la diferencia era de alrededor 2 órdenes (Fig. 16b). Esto confirmaría el efecto protector que ejercería la formulación de harinas de trigo integral y de soja, respecto a la de trigo, frente a la supervivencia de estas bacterias como se observó en la simulación de la digestión gastrointestinal (sección anterior).

El efecto del recubrimiento es notorio para ambas formulaciones de galletitas comparadas con sus respectivos controles, principalmente a partir de los 10 días de almacenamiento (Fig. 16 a y b). Las muestras con recubrimiento con y sin agregado previo de inulina y trehalosa no mostraron diferencias significativas entre sí.

El almacenamiento evidenció la protección del recubrimiento en las galletitas de harina integral de trigo y harina de soja, a diferencia de los resultados obtenidos para la viabilidad luego del pasaje por el tracto gastrointestinal donde no había diferencias por la presencia del recubrimiento. Esto se podría atribuir a un efecto aditivo entre el tipo de formulación y la presencia de recubrimiento.

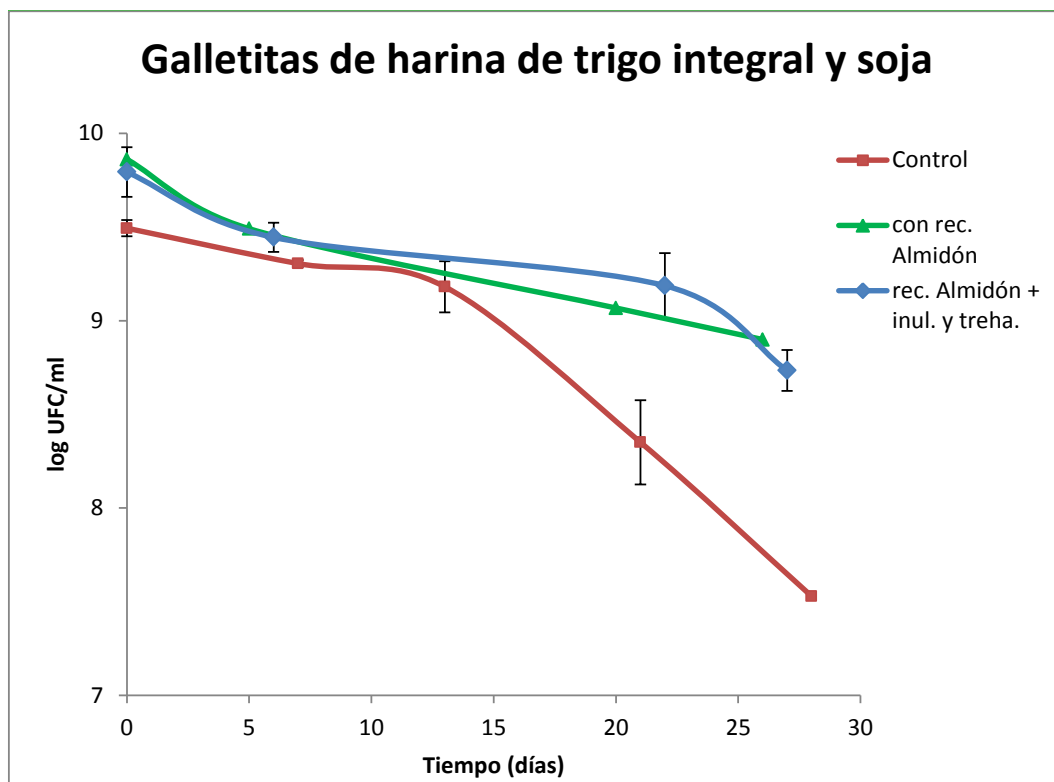
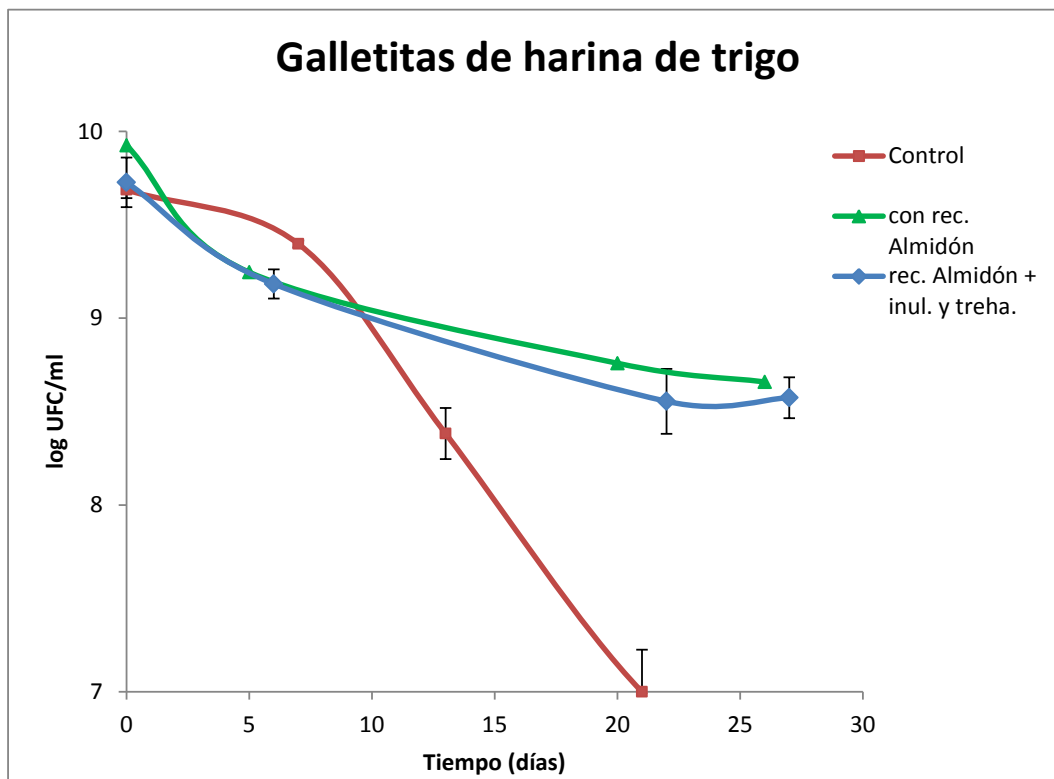


Fig. 16: Efecto del almacenamiento sobre las recuentos de *L. plantarum* en galletitas control y con recubrimiento a base de almidón

a) Galletitas de harina de trigo

b) Galletitas de harinas de trigo integral y soja



Luego de 22 días de almacenamiento, la digestión *in vitro* realizada sobre las galletitas con inulina y trehalosa + recubrimiento de almidón y glicerol, produjo un descenso similar de los órdenes de magnitud al del ensayo realizado sin almacenamiento.

Aunque no resultaron significativos en estos ensayos, la trehalosa y la inulina podrían ejercer sus efectos benéficos cuando las bacterias estén en el intestino y favorecer su desarrollo como se destaca en la literatura (Reinhart, 1997; Li y col., 2008).

## CONCLUSIONES

❖ El contenido de humedad no superó el 12 % y la actividad acuosa de las diferentes galletitas no superó 0,60, permitiendo que estos productos sean seguros frente al crecimiento microbiano y presenten alta estabilidad frente a las reacciones de deterioro mediadas por el agua.

❖ El análisis de textura permitió seleccionar la condición de horneado de 140°C durante 45 min para obtener galletitas duras y crocantes más apropiadas para cánidos adultos.

❖ La composición de la formulación influyó sobre las características de textura y color.

❖ Se seleccionó el recubrimiento de almidón con glicerol (plastificante) para los ensayos ya que contribuyó a la mayor supervivencia de las bacterias luego del pasaje por el sistema gastrointestinal simulado.

❖ En el caso de las galletitas de trigo, el agregado de recubrimiento fue efectivo en la protección de *L. plantarum* frente al sistema simulado, ya que se observó un mayor recuento de bacterias viables respecto al control. La presencia de trehalosa e inulina aportó una protección adicional a las bacterias en la simulación con HCl + buffer.

❖ La formulación de harina integral de trigo y soja mostró mayor protección que la de trigo sin recubrimiento frente a la digestión *in vitro*.

❖ Los resultados de los recuentos de bacterias dependen de los distintos sistemas de simulación utilizados. Para facilitar las comparaciones con otros autores se deben especificar las condiciones utilizadas.

❖ En cuanto al almacenamiento, la dureza de este producto no varió con el tiempo, ni con el tipo de formulación. Sin embargo, el tiempo de almacenamiento redujo la crocancia de las galletitas.

❖ La presencia de inulina y trehalosa no mostró un efecto significativo sobre la supervivencia de las bacterias durante el almacenamiento.

❖ El recubrimiento de almidón con glicerol logró, para ambas formulaciones de galletitas comparadas con sus respectivos controles, preservar un alto título de bacterias probióticas viables durante un mes de almacenamiento.

❖ La digestión realizada a los 22 días de almacenamiento provocó la misma disminución de órdenes de magnitud que la realizada sin almacenamiento.

❖ El almacenamiento permitió evidenciar la protección del recubrimiento en las galletitas de harina integral de trigo y harina de soja, a diferencia de los resultados obtenidos de la viabilidad luego del pasaje por el sistema simulado. Esto podría atribuirse a un efecto aditivo entre el tipo de formulación y la presencia de recubrimiento.

- Ashenafi, M. y Busse, M.** (1991). Growth potential of *Salmonella infantis* and *E. coli* in fermenting tempeh made from horsebean, pea and chickenpea and their inhibition by *L. plantarum*. J. Sci. Food Agric. 55: 607-615.
- Baik O. D., Marcotte M., Castaigne F.** (2000). Cake baking in tunnel type multy-zone industrial ovens. Part II. Evaluation of quality parameters. Food Research International, 33:599-607.
- BeMiller, J. N y Whistler. R. L.** (2000). Capítulo 4. Fennema, Química de los Alimentos. 2.<sup>a</sup> Edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza (España).
- Bertola, N.** (1992) Vinculación entre modificaciones estructurales y microestructura durante la maduración de quesos en películas plásticas. *Tesis doctoral*, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de la Plata.
- Bruno, E.** (2009). Desarrollo de un suplemento alimentario para cánidos domésticos adultos sanos con dietas de mantenimiento. *Tesis doctoral*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J.** (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. J. of Food Engineering, 104: 467-483.
- CAA** (Código Alimentario Argentino) Artículo 1381.
- CAA** (Código Alimentario Argentino) de la Canal y Asociados SRL. Capítulo IX Alimentos Farináceos, Cereales, harinas y derivados. Actualizado Junio del 2004, 643-766. Disponible en: [www. anmat gov. Ar /CODIGO A / CAA 1.HTM](http://www.anmat.gov.ar/CODIGO_A/CAA_1.HTM).
- Case L.P., Carey D.P. y Hirakawa D.A.** (1997). Nutrición canina y felina. Ed. Harcourt Brace, 159-168.
- Cerruti, P.; Segovia de Huergo, M.; Galvagno, M.; Schebor, P y Buera M. P.** (2000). Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. Appl. Microbiol. Biotechnol, 54: 575-580.
- Cheftel J. C. y Cheftel H.,** (1977). Introducción a la bioquímica y tecnología de los alimentos. Capítulo VII. Editorial Acribia S. A, España.
- Chen, L. y Subirade, M.** (2006). Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. Biomaterials, 27: 4646-4653.
- De Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M.** (1960). A medium for cultivation of lactobacilli. J. of Appl. Bact. 23: 130-135.
- Desmukh, A.** (1998). Perfil de nutrientes de alimentos para caninos y comprobación nutricional adecuada de alimentos para caninos de diferentes etapas de la vida. Congreso de la Asociación Mundial de Medicina Veterinaria de Pequeños Animales. As. As. Resúmenes 1:33-36.

**Ding, W. K. Y Shah, N. P.** (2007). Acid, bile and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *J. Microbiolgy and Safety*, 72(9): 446-450.

**FAO/WHO** (Food Agriculture Organization/World Health Organization). (2002). Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Drafting guidelines for the evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canadá.

**Fennema O. R.** (2000). Capítulo 2. Fennema, Química de los Alimentos.2.<sup>a</sup> Edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza (España).

**García, M. A., Martino M. N. y Zaritzky, N. E.** (2001). Composite starch-based coatings applied to strawberries (*Fragaria × ananassa*). *Nahrung/Food*, 45 (4): 267-272.

**García, M.; Pinotti,A.; Martino M. and Zaritzky N.** (2009). Characterisation Of Starch and Composite Edible Films and Coatings. En “Edible Films and Coatings for Food Applications”. Milda Embuscado. New York, EEUU.

**Garrote, G. L.** (2000). Bacterias lácticas y levaduras para la industria alimentaria: kefir. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

**Garrote, G., Abraham, A. y De Antoni, G.** (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *J. of Dairy Res.* 68: 639-652.

**George, M. y Abraham, E.** (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan. *J. Of Controlled Release*, 114: 1-14.

**Gilson, C. Y Thomas, A.** (1995). Calcium alginate bead manufacture: with and without immobilised yeast. Drop formation at a two-fluids nozzle. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 62: 227-232.

**Gismondo, M., Drago, I. y Lombarda, A.** (1999). Review of probiotics available to modify gastrointestinal flora. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 12: 287-292.

**Gupta T. R.** (2001). Individual heat transfer modes during contact baking of Indian unleavened flat bread (chapati) in a continuous oven. *J. of Food Engineering*, 313-319.

**Isolauri, E.** (2001). Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr.* 73: 1142 S – 6S.

**Iyer, C. y Kailasapathy, K.** (2005). Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *J. Food Science*, 70: 19-23.

**Kakisu, E. J., Hugo, A. A., Pérez, P. F., Abraham, A. y DE Antoni, G. L.** (2006). Estudio del efecto antagónico de Lactobacilos y sus paredes contra la acción de *Escherichia coli enterohemorrágica* (O157:H7) en cultivos celulares.

3° Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos, Buenos Aires, Argentina. 152.

**Katkov, I. y Levine, F.** (2004). Prediction of the glass transition temperature of water solutions: comparison of different models. *Cryobiology*, 49: 62–82.

**Katz, E.E., y Labuza, T.P.** (1981). Effect of Water Activity on the Sensory Crispness and Mechanical Deformation of Snack Food Products. *J. of Food Science*, 46:403-409.

**Khalida, S. , Godward, G. , Reynolds, N., Arumugaswamy, R., Peiris, P., Kailasapathy, K.** (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International J. Food Microbiology*, 62: 47–55.

**Kolida, S., K. Tuohy y G. R. Gibson** (2002). Prebiotic effects of inulin and oligofructose. *British J. of Nutrition* 87, Suppl. 2, 193–197.

**Krasaekoopt, W., Bhandari, B. y Deeth, H.** (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* 14: 737-743.

**Lankankaputhra, W. E. V. y Shah, N.P.** (1995). Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp in the presence of acid and bile salts. *Cult. Dairy Prod.* 30 (3): 2-7.

**Lee, K. y Heo, T.** (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in Calcium Alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 869-873.

**Li, X. y Chen, X. G.** (2009). Drying of micro-encapsulated lactic acid bacteria - Effects of trehalose and immobilization on cell survival and release properties. *J. Ocean University of China (English Edition)* 8(1): 39-44.

**Li, X. Y.; Chen, X. G.; Liu, C. S.; Peng, H. N. y Cha, D. S.** (2008). Effect of Trehalose and Drying Process on the Survival of Encapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Drying Technology*, 26(7): 895-901.

**Linders, L.; de Jong, G.; Meerdink, G.; van't Riet, K.** (1997). Carbohydrates and the dehydration inactivation of *Lactobacillus plantarum*: The role of moisture distribution and water activity. *J. of Food Engineering*, 31(2): 237–250.

**Linders, L.; Wolkers, W.; Hoekstra, F.; van 't Riet, K.** (1997). Effect of Added Carbohydrates on Membrane Phase Behavior and Survival of Dried *Lactobacillus plantarum*. *Cryobiology*, 35(1): 31–40.

**Martins, F.; Miranda, I.; Rosa, C.; Nicoli, J. y Neves, M. J.** (2008). Effect of the trehalose levels on the screening of yeast as probiotic by *in vivo* and *in vitro* assays. *Brazilian J. of Microbiology*, 39: 50-55.

**Mazzobre, M.; Longinotti, M. P.; Corti, H.; Buera, M.,** (2001). Effect of salts on the properties of aqueous sugar systems in relation to biomaterial stabilization. *Criobiology*, 43: 199-210.

**Morris V. J., Orford, P. D.** (1987). The gelation and crystallisation of amylopectin carbohyd. Res., 162: 277-293.

**Muck, R.** (1996). Inoculation of silage and its effect on silage quality. In: Proceedings of the Dairy Forage Research Center Conference with Dairy and Forage Industries. Madison, WI, US Dairy Forage Res. Ctr. 43-51.

**Padgett, S.R., K.H. Kolacz, X. Delannay, D.B. Re, B.J. LaVallee, C.N. Tinus, W.K. Rhodes, Y.I. Otero, G.F. Barry, D.A. Eichholtz, V.M. Peschke, D.L. Nida, N.B. Taylor, & G.M. Kishore.** (1995). Development, identification, and characterization of a glyphosate-tolerant soybean line. *Crop Sci.* 35:1451-1461.

**Perdigón, G., Medici, M., Bibas Bonet de Jorrat, M E., Valverde de Budeger, M., Pesce de Ruiz Holgad, A.** (1993). Immunomodulating effects of lactic acid bacteria on. 9: 29-52.

**Perdigón, G., Nader de Macias, M. E., Alvarez, S., Oliver, G. y Pesce de Ruiz Holgad, A.** (1990). Prevention of gastrointestinal infection using immunobiological methods with milk fermented with *L.casei* and *L.acidophilus*. *J. of Dairy Research*. 57: 255- 264.

**Ramos, N., Lúquez, J., G. Eyherabide, G.** Calidad de la harina de soja sometida a distintos tratamientos térmicos para inactivar los factores antinutricionales. Unidad Integradora Balcarse. Tecnología de procesos. 681-683.

**Reinhart G. A.** (1997). Prebiotics in pets nutrition. 7° annual congress ESVIM, Lyon 56-58.

**Reinheimer, J. A.** (1994). Las bacterias Lácticas. *Ciencia y tecnología de los productos Lácteos*. 64-113. Diagrama S.A., Santa Fe, Argentina.

**Santagapita, P. R.; Gómez Brizuela, L.; Mazzobre, M. F.; Ramirez, L.; Corti, H.; Villalonga Santana, R. y Buera, M. P.** (2008). Structure/Function Relationships of Several Biopolymers as Related to Invertase Stability in Dehydrated Systems. *Biomacromolecules*, 9: 741-747.

**Secretaria de Agricultura de Ganadería y Pesca (SAGPyA)** [en línea]: <[http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r\\_34/articulos/consolidacion\\_tendencia.htm](http://www.alimentosargentinos.gov.ar/03/revistas/r_34/articulos/consolidacion_tendencia.htm)>. Acceso: 4-12-2007.

**Shah, N. P.** (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *J. of Dairy Sci.* 83: 894-907.

**Singer, M.A. y Lindquist, S.** (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *Trends Biotechnol.*, 16: 460-468.

- Southgate, D. A. T.**, (1995) Dietary fibre análisis. Royal Society of Chemistry Cambridge (United Kingdom) 170. index.
- Spiegel, J. E., Rose, R., Karabell, P., Francos, V. H. y Schmitt, D. F.** (1994). Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. Food Technology 48: 85-89.
- Sriamornsak, P. y Kennedy, R.** (2008). Swelling and diffusion studies of calcium polysaccharide gels intended for film coating. International J. of Pharmaceutics, 358: 205-213.
- Stevenson, D. G., George, J. Inglett, G. E.** (2007). Structure and physicochemical properties of starch from immature seeds of soybean varieties (Glycine max (L) Merr) exhibiting normal, low-linolenic or low saturated fatty acid oil profiles at maturity. Elsevier. Carbohydrate Polymers 70: 149-159.
- Strickling, J. A., Harmon, D. L., Dawson, K. A., Gross, K. L.** (2000). Evaluation of oligosaccharide addition to dog diets. Influences on nutrient digestion and microbial populations. Animal Feed and Tech., 86:205-219.
- Tamine, A. Y. y Robinson, R. K.** (1985). *Yogurt Science and technology*. Oxford: Pergamon Press, 365-373.
- Tanabe, Y.** (2001). The roles of domesticated animals in the cultural history of the humans. Asian- Aust. J. Anim. Sci., Special Issue 14: 13-18.
- Tannock, G. W., Munro, K., Bibiloni, R., Simon, M.A., Hargreaves, P., Gopal, P., Harmsen, H. y Welling, G.** (2004). Impact of Consumption of Oligosaccharide-Containing Biscuits on the Fecal Microbiota of Humans. Applied and environmental microbiology, 70 (4), 2129–2136.
- Tomomatsu H.** (1994). Health effects of oligosaccharides. Food Tech., 61-65.
- Ullmann P.** (1948). Productos agrícolas alimenticios y medicinales. Enciclopedia de química industrial, 6(1): 355-376.
- Vasconcellos, J. A** (2001). Los Alimentos del futuro. La alimentación Latinoamericana, 231: 11-21.
- Wang X.S., Tang C.H., Yang X.Q.; Gao W.R.** (2008). Characterization, amino acid composition and in vitro digestibility of hemp (Cannabis sativa L.) proteins. Food Chemistry 107:11-18.
- Wang y Gibson, G.R.** (1993). Effects on the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. J. of Applied Bacteriology 75: 373-380.
- Whistler, R. L. Y Be Miller J. N.** (1984). Molecular structure of starch. En: starch., chemistry and technology. Academic Press, EEUU.
- Yuksel, N.; Kanik, A. Y Baykara, T.** (2000). Comparison of in vitro dissolution profiles by ANOVA-based, model-dependent and – independent methods. International J. Pharmaceutics, 209: 57-67.